

**NACHWEIS VON ORAL VERABREICHTEN ANTIKÖRPERN  
GEGEN CANINES PARVOVIRUS - 2 IM  
KOT VON HUNDEN .**

**JOACHIM HASENMAIER**

Disbui. München

1989





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41554827\\_0092](https://archive.org/details/IA41554827_0092)



Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie  
Infektions- und Seuchenmedizin  
der

Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-  
Universität

München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Mayr

Nachweis von oral verabreichten Antikörpern gegen  
canines Parvovirus-2 im Kot von Hunden.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der

Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-

Universität

München

von

Joachim Hasenmaier

aus

Vaihingen/Enz

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr.h.c.mult. A. Mayr

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Dr.habil M. Stangassinger

Tag der Promotion: 24. Februar 1989

## Meinen Eltern



## Inhaltsverzeichnis

## Seite

|        |                                                                              |    |
|--------|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.     | Einleitung                                                                   | 1  |
| 2.     | Schrifttum                                                                   | 2  |
| 2.1.   | Klassifizierung caniner Parvoviren                                           | 2  |
| 2.2.   | Pathogenese der Parvovirose                                                  | 3  |
| 2.2.1. | Prädisponierende Faktoren für eine Erkrankung<br>an CPV-2                    | 3  |
| 2.2.2. | Virusaufnahme                                                                | 4  |
| 2.2.3. | Virusvermehrung                                                              | 6  |
| 2.2.4. | Verlauf der Parvovirose                                                      | 7  |
| 2.3.   | Immunologie der Parvovirose                                                  | 9  |
| 2.4.   | Orale Verabreichung von Antikörpern zur<br>Prophylaxe von Gastroenteritiden. | 12 |
| 2.5.   | Dotterantikörper                                                             | 15 |
| 3.     | Eigene Untersuchungen                                                        | 17 |
| 3.1.   | Material und Methoden                                                        | 17 |
| 3.1.1. | Virusvermehrung                                                              | 17 |
| 3.1.2. | Hämagglutinationstest ( HA )                                                 | 17 |
| 3.1.3. | Reinigung von CPV-2                                                          | 18 |
| 3.1.4. | Serologische Untersuchungen                                                  | 18 |
| 3.1.5. | Herstellung monoklonaler Antikörper gegen<br>CPV-2                           | 21 |
| 3.1.6. | Immunisierung der Hühner                                                     | 22 |
| 3.1.7. | Aufreinigung des Eidotters                                                   | 22 |
| 3.1.8. | In vitro-Untersuchungen über die Resistenz von<br>Dotter-AK                  | 24 |
| 3.1.9. | In vivo-Untersuchungen über die Resistenz von<br>Dotter-AK                   | 25 |
| 3.2.   | Ergebnisse                                                                   | 28 |
| 3.2.1. | Virusvermehrung und Reinigung                                                | 28 |
| 3.2.2. | Herstellung monoklonaler Antikörper                                          | 28 |
| 3.2.3. | Immunisierung der Hühner und Aufreinigung des<br>Eidotters                   | 30 |

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.4. In vitro-Untersuchungen über die Resistenz von<br>Dotter-AK | 32 |
| 3.2.5. In vivo-Untersuchungen über die Resistenz von<br>Dotter-AK  | 38 |
| 4. <b>Besprechung der Ergebnisse</b>                               | 48 |
| 5. <b>Zusammenfassung</b>                                          | 59 |
| 6. <b>Summary</b>                                                  | 61 |
| 7. <b>Literaturverzeichnis</b>                                     | 63 |

## 1. Einleitung

Ein wichtiger Faktor in der Pathogenese infektiös bedingter Gastroenteritiden bei Jungtieren sind lokal im Dünndarm vorhandene Antikörper. Solche Antikörper können Jungtiere vor Durchfallerkrankungen, verursacht durch Rota- und Coronaviren oder enterotoxische E.coli, schützen. Spezifische Antikörper werden über das Kolostrum ausgeschieden und können dann im Darmtrakt wirksam werden, allerdings nur über kurze Zeit. Eine Möglichkeit die Menge und die Dauer der Sekretion der Antikörper zu steigern, ist die Muttertier-vakzinierung. Eine Alternative stellt die Gabe von Antikörpern anderer immunisierter Tiere dar. Dies gilt besonders, wenn die Empfänglichkeit für eine Erkrankung über die Säugeperiode hinaus besteht. Über solche Versuchsansätze wurde wiederholt berichtet. Der Erfolg dieser prophylaktischen Maßnahmen wurde jedoch nur über das klinische Bild gezeigt. Angaben über die Wiederfindung biologischer Aktivität der verabreichten Antikörper sind dagegen spärlich. Für Dotter-Antikörper, die in jüngster Zeit vermehrt zu diagnostischen und prophylaktischen Zwecken eingesetzt wurden, fehlen solche Daten bisher.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Wiederauf-findung von Dotter-Antikörpern gegen CPV-2 in Kot-proben von Hunden, denen diese verabreicht worden waren. Dabei sollten besonders biologische Aktivi-täten gegen CPV-2 nachgewiesen werden. Das Modell CPV-2 wurde, neben einer möglichen praktischen Anwen-dung zur Prophylaxe dieser Erkrankung, auch gewählt um mit heterologen, nicht resorbierten Antikörpern in weitergehenden Versuchen die Rolle eines lokalen Geschehens im Dünndarm bei der Parvovirose abklären zu können.

## 2. Schrifttum

### 2.1. Klassifizierung caniner Parvoviren

Im Jahre 1967 wurde im Kot eines klinisch gesunden Hundes ein Parvovirus entdeckt, das Minute Virus of Canines ( MVC ) bzw. CPV-1 genannt wurde ( Binn et al., 1970 ). Elf Jahre später trat plötzlich gleichzeitig in Europa, USA, Asien und Australien ein unweit pathogeneres canines Parvovirus auf, das schwere Gastroenteritiden und plötzliche Todesfälle infolge einer Myokarditis bei Welpen verursachte ( Schwers et al., 1979; Osterhaus et al., 1980; Carmichael und Binn, 1981 ). Diese Erkrankung wurde als Parvovirose bezeichnet und das auslösende Virus als CPV-2 klassifiziert. Sein Ursprung konnte nicht eindeutig geklärt werden. Da es sich von dem feline Panleukopenievirus ( FPV ) und dem Nerzenteritisvirus ( MEV ) in nur wenigen Nukleotiden unterscheidet ( McMaster et al., 1981; Tratschin et al., 1982; Parrish und Carmichael, 1983 ) wurde spekuliert, daß es durch Mutation eines anderen Parvoviruses, möglicherweise in Zellkultur ( Johnson und Spradbrow, 1979 ), entstanden sein könnte.

Beim caninen Parvovirus handelt es sich um ein kleines ( 20 nm im Durchmesser ), unbehülltes, icosaedrisches, DNA-haltiges Virus ( Appel et al., 1978; Burtonboy et al., 1979; McCandlish et al., 1979; Arens und Krauss, 1980 ). Intakte Virionen besitzen ein spezifisches Gewicht von  $1,44 \text{ g/cm}^3$ , während leere Kapside, welche häufig in Zellkulturen zu finden sind, ein spezifisches Gewicht von  $1,32 \text{ g/cm}^3$  aufweisen ( Burtonboy et al., 1979; Paradiso et al., 1982 ). CPV-2 hämagglutiniert Erythrozyten von Schweinen, Katzen und Rhesusaffen ( Appel et al.,

1979; Carmichael et al., 1980; Walker et al., 1980; Azetaka et al., 1981 ) bei einem pH zwischen 6,0 - 8,2 und einer Temperatur von 4 °C. Infektiöse Virionen sind extrem widerstandsfähig. Eine Inaktivierung ist möglich mit einer 0,5%igen Formalinlösung, mit Hypochlorid-Lösung, Betapropiolacton, Hydroxylamin oder ultravioletter Bestrahlung ( Scott, 1980; Afshar, 1981 ).

## 2.2. Pathogenese der Parvovirose

Die Pathogenese dieser viralen Erkrankung ist noch nicht in allen Punkten geklärt. Die Infektion erfolgt durch die Aufnahme virushaltigen Materiales aus der Umgebung. Dabei genügt ein Gramm Kot eines akut erkrankten Hundes theoretisch, um eine Million empfänglicher Hunde zu infizieren ( Appel, 1987 ). Über den weiteren Verlauf der Pathogenese, insbesondere über die primäre Virusreplikation, herrschen unterschiedliche Meinungen vor. Diskutiert werden die Virusaufnahme über den Pharynx oder über den Dünndarm. Der Ausgang einer Infektion wird zudem durch andere Faktoren mitbestimmt.

### **2.2.1. Prädisponierende Faktoren für eine Erkrankung an CPV-2**

Ausschlaggebend für die Pathogenese der Parvovirose ist das Vorhandensein von sich aktiv replizierender DNA, also einer sich schnell teilenden Zellpopulation ( Siegl, 1976 ). Deshalb sind die am meisten betroffenen Gewebe bei Welpen das Myokard und die Kryptzellen des Dünndarmes. Wie von Bishop und Hine ( 1975 ) gezeigt, weisen die kardialen Myozyten in den ersten zwei Lebenswochen eine sehr hohe Mitoserate auf, die in den folgenden Wochen von einer Steigerung der Mitoserate der Kryptzellen des Dünndarmes abgelöst

wird. Die Mitoserate ist zusätzlich von äußeren Faktoren abhängig. So bewirkt ein Absetzen von der Mutter bei den Welpen eine vermehrte Proliferation der Kryptzellen ( Koldovsky et al., 1966 ). Welpen werden im Alter von fünf bis sieben Wochen abgesetzt, und hier treten gehäuft schwere, durch Parvovirose verursachte, Gastroenteritiden auf ( McCandlish et al., 1981 ). Carman und Povey ( 1982 ) beobachteten bei einem Infektionsversuch, daß die Parvovirose pathogener verlief, nachdem sie die Hunde zunächst hungern ließen, um schließlich kurz vor der Infektion wieder mit der Fütterung zu beginnen. Bei Vergleichen zwischen Hunden aus einer SPF-Zucht und natürlich gehaltenen zeigte sich eine höhere Anfälligkeit der letzteren Gruppe. Dies wird erklärt durch gleichzeitige Darminfektionen, zB. mit Giardien, die zusätzlich das Infektionsrisiko erhöhen ( Pollock, 1982 ). War zu Beginn des Auftretens der Parvovirose der plötzliche Herztod infolge einer kongestiven Myokarditis das vorherrschende klinische Bild ( von Sandersleben, 1979; Lenghaus, 1980 ), zeigt sie sich inzwischen fast ausschließlich in Form einer Gastroenteritis, meist um den Zeitpunkt des Absetzens von der Mutter. Deshalb soll an dieser Stelle ausschließlich auf die Pathogenese und Immunologie der Darmerkrankung eingegangen werden.

### **2.2.2. Virusaufnahme**

Wie bereits erwähnt, herrschen über den Ort der primären Virusaufnahme unterschiedliche Meinungen vor. Untersuchungen von Meunier et al. ( 1985 ) sowie von Potgieter et al. ( 1981 ) ergaben, daß dieser Ort der Pharynxbereich bzw. die Tonsillen sein müßten. Mit Hilfe der Immunofluoreszenz- bzw. der Immunoperoxidasetechnik konnte Virus nach oraler bzw. parenteraler Infektion erstmals am zweiten und drit-

ten Tag in den Tonsillen und den retropharyngealen Lymphknoten nachgewiesen werden. Erst ab dem vierten Tag fanden die Autoren infizierte Darmepithelzellen und Virionen im Kot. Zusätzlich konnte eine Erkrankung durch parenterale Verabreichung eines Immunserrums, selbst noch einen Tag nach der Infektion, verhindert werden. Potgieter et al. ( 1981 ), die Hunde oral und intragastral infizierten, konnten bei der letzteren Gruppe lediglich eine Serokonversion ohne klinische Erkrankung feststellen, während die oral infizierte Gruppe klinisch erkrankte. Nach diesen Autoren ist die Parvovirose des Hundes ausschließlich eine systemische Erkrankung.

Im Gegensatz zu Meunier et al. ( 1985 ) fanden Carman und Povey ( 1985 ) am ersten und zweiten Tag nach einer oralen Infektion nekrotische Epithelzellen in den Krypten des Duodenums und des Jejunums, die über den Peyer'schen Platten lagen. Zusätzlich entdeckten sie einige karyorrhektische Nuklei in den Peyer'schen Platten des Ileums. Sie interpretierten dies als begrenzte, lokale Virusvermehrung, die allerdings nicht ausreichend war, um sie mit immunologischen Techniken nachzuweisen. Eine Virusisolierung gelang erstmals am zweiten Tag aus den mesenterialen Lymphknoten, bevor am dritten Tag ein geringer Virustiter in den Tonsillen, der Lunge, dem Duodenum und dem Ileum festgestellt wurde. Eine Virämie konnte erst ab dem vierten Tag nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit Befunden von O'Sullivan et al. ( 1984 ). Diese Autoren beobachteten am dritten Tag nach einer oralen Infektion eine Nekrose der Peyer'schen Platten und erst ab dem fünften bis siebten Tag eine Nekrose der Tonsillen und des Thymus. Macartney et al. ( 1984 ) fanden ab dem ersten Tag nach der Infektion Virusantigen im Thymus und erst ab dem zweiten Tag in den Lymphknoten einschließlich der

Tonsillen und der retropharyngealen Lymphknoten. Für eine Virusaufnahme über den Darm sprechen auch die Befunde nach intragastraler Verabreichung von CPV-2 ( Potgieter et al., 1981; Osterhaus et al., 1980 ). Es kam zwar nicht zu klinischen Erkrankungen, aber zu einer Serokonversion. Pollock ( 1982 ) erzielte nach oraler und parenteraler Infektion dieselben Symptome, allerdings traten diese nach parenteraler Infektion 24-48 Stunden früher auf. Die Autoren schließen daraus, daß bei der parenteralen Infektion ein Schritt in der Pathogenese übergangen worden sein mußte, nämlich die primäre Virusvermehrung in den Peyer'schen Platten. Um in die Peyer'schen Platten zu gelangen, könnte das Parvovirus den selben Weg nehmen, der für Reovirus bei der Maus nachgewiesen werden konnte. Dieses wird nach intragastraler Verabreichung von den M-Zellen aufgenommen und vermehrt sich zunächst in den Peyer'schen Platten ( Torres-Medina, 1981 ). Erst acht Stunden p.i. konnte es aus den mesenterialen Lymphknoten isoliert werden ( Wolf et al., 1981; Kauffman et al., 1983 ).

### 2.2.3. Virusvermehrung

Wurde das Virus im Pharynx aufgenommen, kann es nur im Zuge einer Virämie zu einer Infektion des Darmes kommen. Nach einer primären Vermehrung im Pharynx gelangt es zellfrei oder zellgebunden über den Kreislauf in die sekundär affinen Organe, insbesondere den Darm. Eine Virämie wird vor der Erkrankung des Darmes regelmäßig beobachtet ( Pollock, 1982 ). Meunier et al. ( 1981 ) berichten darüber hinaus von einer zweiphasigen Virämie.

Fand die Primärinfektion dagegen im Darm statt, bestehen grundsätzlich zwei mögliche Pathogeneseformen:

a) Das Virus vermehrt sich sofort in den Kryptzellen des Dünndarmes; die Parvovirose des Hundes wäre somit ein rein lokales Geschehen. Dagegen spricht vor allem die konstant auftretende Virämie und die Möglichkeit der Verhinderung einer Erkrankung an CPV-2 durch parenterale Verabreichung eines Immunserums. ( Meunier et al., 1985 ).

b) Das Virus gelangt zunächst in die Peyer'schen Platten. Dort findet die primäre Virusreplikation statt mit anschließender weiterer Ausbreitung des Virus über zirkulierende Lymphozyten. McDermott und Bienenstock ( 1979 ) konnten nachweisen, wie lokale Lymphozyten des Darmes nach einer Wanderung durch den Körper wieder an ihren Ausgangspunkt zurückkehrten ( "lymphocyte homing" ). Rudzik et al. ( 1975 ) beschrieben einen viertägigen Zyklus, während dessen die Lymphozyten sich stark vermehrten und anschließend zur Darmschleimhaut zurückkehrten. Dasselbe Phänomen zeigten Willard und Leid ( 1981 ) für zirkulierende IgA-produzierende Plasmazellen im Dünndarm des Hundes. So könnten die Kryptzellen des Dünndarmes nach einer zellgebundenen, virämischen Phase infiziert werden.

#### **2.2.4. Verlauf der Parvovirose**

Im Gegensatz zur Virusaufnahme wird der Verlauf der Parvovirose von allen Autoren einheitlich beschrieben. So wurden Hunde zur Abklärung des Verlaufs parenteral ( Appel et al., 1979; Eugster, 1980; Robinson et al., 1980; Carmichael et al., 1981; Pollock, 1982 ), parenteral-oral ( Eugster, 1980; McAdaragh et al., 1982; Wierup et al., 1982 ), oral ( Carmichael et al., 1980; Azetaka et al., 1981; Povey, 1982 ), oronasal ( Carmichael et al., 1981, 1983; Potgieter et al., 1981; Bass et al., 1982; Pollock, 1982; Pollock und Carmichael, 1982, 1983 ),

intranasal ( Appel et al., 1979 ) und intragastral ( Osterhaus et al., 1980; Potgieter et al., 1981 ) infiziert. Nahezu Übereinstimmend wurden folgende Beobachtungen gemacht: zwischen dem ersten und dritten Tag nach der Infektion kann eine ansteigende Virusmenge in Tonsillen, Thymus, retropharyngealen und mesenterialen Lymphknoten, Milz und Knochenmark nachgewiesen werden. Ab dem vierten Tag p.i. zeigen alle Hunde eine Virämie, während der aus sämtlichen Geweben Virus isoliert werden kann. Zum selben Zeitpunkt treten erhöhte Körpertemperatur und eine Lymphopenie auf ( Macartney et al., 1984; Meunier et al., 1985; Carman und Povey, 1985 ). Die Lymphopenie rührt hauptsächlich von einer Lymphozytolyse im Thymus, den Lymphknoten, der Milz und den Peyer'schen Platten her ( Appel et al., 1979; Carman und Povey, 1980; Robinson et al., 1980; Carmichael et al., 1981; Potgieter et al., 1981 ). Eine Leukopenie, beruhend auf einer Neutropenie, wird nur bei klinisch erkrankten Hunden beobachtet ( Robinson et al., 1980; Potgieter et al., 1981 ). Sie wird durch einen massiven Verlust von neutrophilen Granulozyten durch das geschädigte Darmepithel in das Darmlumen verursacht. Da die Knochenmarkszellen meist nur sehr geringgradig geschädigt werden ( Macartney et al., 1984 ), ist der oben genannte Verlust von neutrophilen Granulozyten für die beobachtete Depletion des Knochenmarks verantwortlich. Zu einer massiven Infektion des Kryptepithels des Dünndarmes kommt es ab dem vierten Tag und darauffolgend bis zum zehnten Tag zu einer Virusausscheidung im Kot, allerdings mit starken individuellen Schwankungen ( Carmichael et al., 1980, 1981; Azetaka et al., 1981; Chapek et al., 1981; Meunier et al., 1981; Bass et al., 1982; Pollock, 1982; Pollock und Carmichael, 1982, 1983; Povey, 1982 ). Das Maximum der Virusausscheidung liegt zwischen dem vierten und dem siebten Tag ( Carmichael et al.,

1980, 1981; Pollock et al., 1982 ). Der gesamte Dünndarm ist in das Krankheitsgeschehen mit einbezogen, nicht aber der Magen und das Colon ( Nelson et al., 1979; Robinson et al., 1980; ). Unterschiedliche Angaben werden zur Frage gemacht, welcher Dünndarmschnitt am meisten betroffen ist. So sind nach Untersuchungen von Meunier et al. ( 1985 ) vor allem das Duodenum und das Ileum verändert, nur geringgradig dagegen der mittlere Jejunalbereich. Macartney et al. ( 1984 ) beschreiben dagegen das Duodenum und das Jejunum als die am meisten betroffenen Bereiche. Die Veränderungen beginnen mit einer Längenabnahme der Darmzotten und dem Auftreten dunkler, amphophiler Zellen in der proliferativen Zone des Kryptepithels. Mit fortschreitender Virusvermehrung kommt es zu einem totalen Verlust der Darmzotten, dem Auftreten von Kerneinschlußkörperchen und letztendlich zu einem Zusammenfließen der Krypten. Die Schleimhaut ist von einer dicken mukoiden Schicht überlagert. Die Lamina propria löst sich auf, und in der Tunica submucosa und muscularis finden sich Ödeme.

### 2.3. Immunologie der Parvovirose

Beim Entstehen einer Parvovirose sind neben der aufgenommenen Virusdosis vor allem passiv vorhandene sowie aktiv gebildete Antikörper von Bedeutung. Die meisten Autoren weisen ab dem fünften Tag p.i. zirkulierende Antikörper ( AK ) im Blut nach. Lediglich Carman und Povey ( 1985 ) finden bereits ab dem dritten Tag p.i. AK in geringen Mengen. Maximalwerte werden bereits am siebten Tag erreicht ( Meunier et al., 1985; Carman und Povey, 1985 ). Zusätzlich zur systemischen Immunantwort scheint auch die lokale Antikörperproduktion an der Immunität beteiligt zu sein. Zur genaueren Abklärung des Einflusses der systemischen und lokalen Immunantwort infizierten

Nara et al. ( 1983 ) Hunde oral zuerst mit virulenten und 6 Monate später zweimal mit avirulenten CPV-2-Stämmen. Nach der ersten Infizierung verglichen sie Serum- und Koproantikörper und nach der zweiten zusätzlich noch Jejunalantikörper. Dabei kam es nach der Primärinfektion zu einem raschen Anstieg von IgM und IgG im Serum. Bis zum 20. Tag p.i. war der IgM-Gehalt wieder auf seinen Ausgangswert gefallen, während der IgG-Gehalt unverändert blieb. In den Fäzes entdeckten die Autoren IgM, IgA und IgG in abnehmender Konzentration, wobei IgA und IgG länger nachweisbar waren als IgM. Die Gabe von attenuiertem Virus hatte auf die Serumtiter keinen Einfluß, im Jejunum und in den Fäzes induzierte dieses Virus jedoch einen Anstieg vor allem der IgG- und IgA-Konzentration. Beim Vergleich der Antikörperkonzentration im Serum und im Kot bzw. direkt im Jejunum war bemerkenswert, daß sie voneinander unabhängig waren. Die hohen Konzentrationen an IgG und IgA im Kot erklären Nara et al. ( 1983 ) mit dem Einwandern von IgG- und IgA-produzierenden Plasmazellen aus den Peyer'schen Platten oder den mesenterialen Lymphknoten ( McDermott et al., 1979 ). Im Gegensatz zu IgA, das aktiv in den Darm sezerniert werden kann ( Bienenstock et al., 1980 ), kommen für IgG hauptsächlich zwei Möglichkeiten in Betracht ins Darmlumen zu gelangen. Zum einen könnte es, wie für andere Serumproteine bewiesen, mittels eines unspezifischen Transportes ins Darmlumen gebracht werden ( Walker et al., 1977 ). Zum anderen ist eine lokale Produktion in Plasmazellen der Lamina propria mit nachfolgender Diffusion ins Lumen denkbar. Dort widersteht IgG noch einen gewissen Zeitraum einer enzymatischen Verdauung, allerdings weniger gut als IgA ( Keren et al., 1980 ).

Rice et al. ( 1982 ) verglichen die Bedeutung systemischer und lokaler AK und deren Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf. Diese Gruppe stellte fest, daß nur Koproantikörper in einer positiven Korrelation zu einem günstigen Krankheitsverlauf und einem geringen HA-Titer im Kot standen. Hohe Serumantikörpertiter dagegen waren oftmals mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf verbunden. Die Autoren kommen deshalb zu dem Schluß, daß die lokale Immunität wichtiger als die systemische zu sein scheint.

Das Vorhandensein maternaler Antikörper ist für den Ausgang einer Infektion bei den hauptsächlich klinisch betroffenen Welpen von enormer Wichtigkeit. Die Übertragung dieser AK geschieht beim Hund zu über 90% über das Kolostrum und nur zu einem sehr geringen Teil schon im Uterus, wie es für die Übertragung von Antikörpern bei Staupe ( Baker et al., 1959; Gillespie et al., 1958 ), bei der infektiösen Hepatitis des Hundes ( Carmichael et al., 1962 ) und schließlich bei der Parvovirose ( Pollock und Carmichael, 1982 ) gezeigt werden konnte. Die Absorption von kolostralen Antikörpern soll bis zum dritten Tag nach der Geburt möglich sein ( Carmichael, 1962 ), und die aufgenommene Menge ist dem Antikörpertiter der Mutter proportional. Für die Parvovirose wird der durchschnittliche Antikörpertiter der Welpen mit 50% des Titers der Mutter angegeben, mit einer Halbwertszeit der Antikörper von 9,7 Tagen ( Pollock und Carmichael, 1982 ). Daraus läßt sich folgern, daß der Immunschutz der Welpen vom Antikörpertiter der Mutter abhängig ist. Zusätzlich gehen aber auch Faktoren wie Wurfgröße und Milchleistung der Mutter in diese Relation mit ein. Vakzinen, die eine starke Immunantwort im Muttertier auslösen, sorgen daher für einen länger andauernden Schutz der Welpen. Allerdings kann mit diesen Muttertierimpfungen nicht der

gesamte Zeitraum abgedeckt werden, in dem Welpen für eine ernsthafte Parvovirose empfänglich sind. Daher müssen die Welpen zusätzlich aktiv immunisiert werden. Trotz des Einsatzes moderner Vakzinen auf der Basis von CPV-2-Stämmen kommt es immer wieder zu Impfdurchbrüchen, als deren Ursachen wiederum maternale AK anzusehen sind. Untersuchungen von Gooding et al. ( 1982 ) sowie Pollock und Carmichael ( 1982 ) zeigten, daß ein HAH-Titer von 1:80 nicht mehr ausreicht, um die Welpen vor einer Erkrankung zu schützen, aber bereits ein HAH-Titer von 1:20 ( in vielen Fällen noch darunter ) eine erfolgreiche aktive Immunisierung unmöglich macht.

#### 2.4. Orale Verabreichung von Antikörpern zur Prophylaxe von Gastroenteritiden.

Die orale Verabreichung von spezifischen Immunglobulinen stellt eine Möglichkeit dar, infektiösen Gastroenteritiden vorzubeugen. Immunglobuline besitzen gegenüber äußeren Einflüssen wie Säuren oder proteolytischen Enzymen eine gewisse Resistenz ( Newby et al., 1976 ). Keren et al. ( 1980 ) inkubierten eine Lösung, die IgG- und IgA-Aktivität gegen ein S.flexneri-E.coli-Hybrid aufwies, zum einen in frisch gewonnenem Dünndarminhalt von Kaninchen, zum anderen in einem chirurgisch freigelegten Dünndarmabschnitt ( Thiry-Vella-Loop ). Bei der in vitro-Inkubation konnten das IgG und das IgA ohne Verlust zurückgewonnen werden. Bei der in vivo-Inkubation wurde IgA zu 50% und IgG zu 42% zurückgewonnen. Newby et al. ( 1976 ) setzten bovines IgG und IgA in vitro Verdauungsenzymen aus, und stellten nach einer Inkubation von zwei Stunden bei IgA keinen, bei IgG nur einen sehr geringgradigen Verlust fest, was mit den von ihnen festgestellten hohen IgG- und IgA-Gehalten im Darmlumen übereinstimmt.

Barnes et al. ( 1982 ) führten in einer Klinik, in der Rotavirus endemisch war, eine Studie durch. Sie verabreichten an 75 Kleinkinder in der ersten Lebenswoche humanes Gammaglobulin, eine Kontrollgruppe erhielt ein Placebo. Dabei zeigte sich bei den Kindern, die Gammaglobuline erhalten hatten, eine verzögerte Ausscheidung von Rotavirus und mildere Symptome im Vergleich zur Kontrollgruppe. Snodgrass et al. ( 1977 ) hatten dies zuvor schon bei gnotobiotischen Lämmern nachgewiesen. Lämmer, die zwischen der 24. und der 72. Lebensstunde mit humanem Anti-Rotavirus-IgG gefüttert und in der 30. Stunde nach der Geburt mit humanem Rotavirus infiziert worden waren, entwickelten im Gegensatz zur Kontrollgruppe keinen Durchfall. Die Virusausscheidung trat zudem verzögert auf und war in der Zeitdauer verkürzt.

In der Veterinärmedizin wurden diese experimentellen Befunde bereits in die Praxis umgesetzt. Hier werden zur Prophylaxe von Erkrankungen, die von Erregern lokaler Infektionskrankheiten des Darmes verursacht werden ( z.B. Rota- und Coronaviren, enterotoxische E.coli ), seit einigen Jahren erfolgreich Muttertiervakzinen eingesetzt. Ziel dieser Impfungen ist es, die Ausscheidung spezifischer AK in der Milch zu erhöhen und zu verlängern ( Bachmann et al., 1982 ). Dieser Ansatz einer Prophylaxe wird dadurch erleichtert, daß Kälber nur während der ersten Lebenswochen nach einer Infektion mit diesen Erregern ernsthaft erkranken. Die Wirksamkeit dieser Muttertierimpfungen wurde in einigen Feldversuchen deutlich demonstriert ( Eichhorn et al., 1982; Bachmann et al., 1985 ). Ein Versuch, maternale AK im Dünndarm oder im Kot nachzuweisen wurde allerdings nicht gemacht. Schwieriger stellt sich die Situation dar, wenn die Empfänglichkeit für eine Erkrankung über einen längeren Zeitraum besteht, wie zB. bei der Rotavirose des Menschen oder

der Parvovirose. Eine kontinuierliche Versorgung mit Muttermilch läßt sich hier nicht mehr gewährleisten. Die Verwendung von Seren immunisierter Tiere ist ein ethisches und finanzielles Problem, daher wurde in letzter Zeit nach Alternativen gesucht. Eine Möglichkeit besteht in der Verabreichung von Kuhmilch, die spezifische Immunglobuline enthält. Zu diesem Zweck behandelten Hilpert et al. ( 1987 ) Kleinkinder, die an akuter Rotavirus-Gastroenteritis erkrankt waren, mit einem Konzentrat, das Milchimmunglobuline enthielt, die von mit humanem Rotavirus hyperimmunisierten Kühen gewonnen worden waren. Dabei kam es zu einer Reduzierung der Zeitdauer der Virusausscheidung. Desweiteren konnten die Autoren in 47% der Stuhlproben Milchimmunglobuline wiederfinden, die in 43% der Proben sogar noch eine neutralisierende Aktivität zeigten. In einer Kontrollgruppe, die aus gesunden Kleinkindern bestand, wurden die Immunglobuline weitaus stärker verdaut. Hier konnten in nur 3% der Fälle AK mit neutralisierender Aktivität wiedergefunden werden. Monoklonale AK, die sich auch in vitro herstellen lassen, wurden ebenfalls auf ihre Verwendbarkeit überprüft. Sherman et al. ( 1983 ) fütterten Kälber zehn Stunden nach der Geburt mit Mäuseaszites, der monoklonale Antikörper gegen das K99-Antigen von E.coli enthielt. Zwei bis vier Stunden später infizierten sie die Kälber mit einem pathogenen E.coli-Stamm. Zwar erkrankten die Kontrollgruppe und die mit AK gefütterte Gruppe an Durchfall, jedoch die letztere Gruppe weit weniger aggressiv, was sich in einem geringeren Grad an Dehydrierung, Gewichtsverlust und letztendlich geringerer Mortalität äußerte.

## 2.5. Dotterantikörper

Das Hühnerei enthält alle AK-Isotypen: IgG, IgA und IgM. Im Eidotter findet sich ausschließlich IgG, im Eiweiß dagegen IgA bzw. IgM ( Rose et al., 1974, 1981 ). Es bestehen zwei Wege, auf denen AK in das Ei gelangen können: zirkulierende AK werden aus dem Plasma aktiv in den Eifollikel sezerniert ( Patterson et al., 1962 ) oder sie gelangen auf dem Weg des Eies durch den Eileiter in das Eiweiß, was aber noch nicht eindeutig geklärt ist. IgG stellt quantitativ den bedeutendsten Anteil ( Dotter enthält IgG-Konzentrationen von 15 mg/ml und mehr ). Das Huhn stellt somit eine in mehrererlei Hinsicht günstige Quelle zur Gewinnung von IgG dar. Zum einen können AK in sehr großen Mengen gewonnen werden, zum anderen stellt die Art und Weise der Gewinnung aus tierschützterischen Gründen einen Vorteil gegenüber herkömmlichen Methoden dar. Zum Einsatz kamen Hühner-AK bisher hauptsächlich als Diagnostika. So wurden sie in den verschiedensten immunologischen Tests wie ELISA, HAH oder Radioimmunoassays gegen eine Vielzahl antigener Strukturen eingesetzt ( Fertel et al., 1981; Piela et al., 1984 ).

Als weitere Einsatzmöglichkeit bietet sich die orale Verabreichung von Hühner-IgG zur Bekämpfung bzw. zum Schutz vor infektiösen Gastroenteritiden an. Yolken et al. ( 1988 ) beschreiben den Einsatz von Hühner-IgG mit einer Aktivität gegen humanes Rotavirus. Sie beziehen sich dabei auf die Ergebnisse von Bartz et al. ( 1980 ). Diese Autoren immunisierten Hühner mit Affen-Rotaviren und isolierten spezifisches IgG aus dem Eidotter. Dieses fütterten sie zweimal täglich drei Tage alten Mäusen. Sie konnten auf diese Weise, nach einer Infektion mit murinem Rotavirus, die Infektionsrate von 90% auf 15% senken.

Hühner-IgG scheint zudem eine gewisse Resistenz gegenüber Säureeinwirkung zu besitzen. Lösche et al. ( 1986 ) zeigten, daß erst nach einer zweistündigen Einwirkung einer 1M HCl-Lösung die AK-Aktivität auf den Nullpunkt abfiel.

### 3. Eigene Untersuchungen

#### 3.1. Material und Methoden

##### **3.1.1. Virusvermehrung**

Zur Viruszüchtung wurden permanente Hunde- bzw. Katzennierenzellkulturen verwendet: Madin - Darby canine kidney ( MDCK, ATCC CCL - 34 ) und Crandell feline kidney ( CRFK, ATCC CCL - 94 ). Als am besten geeignet erwiesen sich die MDCK-Zellen, weshalb nach ersten Vorversuchen ausschließlich mit dieser Zelllinie weitergearbeitet wurde. Als Medium diente Minimal Essential Medium mit Earl's Salzen ( EMEM, Biochrom, Berlin ), dem 8% foetales Kälberserum ( FKS ), 100.000 IE/l Penicillin, sowie 100 mg/l Streptomycin zugesetzt waren. Die Zellen wurden alle drei Tage im Verhältnis von 1:3 unter Verwendung von STV - Lösung ( Mayr et al., 1974 ) geteilt.

Als Saatvirus verwendeten wir den CPV-2-Stamm Ka/Be, den uns dankenswerterweise Herr Prof. Siegl, Bern, zur Verfügung stellte. Zur Vermehrung wurde das Virus zusammen mit 1:3 geteilten MDCK - Zellen in Zellkulturflaschen eingesät und für drei bis fünf Tage bis zum Auftreten eines deutlichen cpE ( cytopathischen Effektes ) bei 37 °C inkubiert. Als Medium diente EMEM, unter Zusatz von 2% FKS. Zur Virusernte und Lagerung wurden die Flaschen bei -20 °C eingefroren.

##### **3.1.2. Hämagglutinationstest ( HA )**

Zur Virustiterbestimmung diente die Hämagglutinationsreaktion ( HA ) mit Schweineerythrozyten ( Carmichael et al., 1980 ). Sie wurde in Mikrotiterplatten nach Standardverfahren durchgeführt. Dazu wurden in jede Vertiefung 25 µl NaCl-

Phosphatpuffer ( NaCl-PP ), pH 7,4, vorgelegt und die Proben in log 2-Schritten verdünnt. Nach Zugabe von 50 µl einer 1%igen Schweineerythrozytenlösung und anschließendem Schütteln wurde die Platte für eine Stunde bei 4 °C inkubiert und dann abgelesen. Als HA-Titer wurde die höchste Verdünnung gewertet, bei der noch eine vollständige Hämagglutination auftrat.

### 3.1.3. Reinigung von CPV-2

Die Virussuspension wurde zunächst zur Abtrennung der Zelltrümmer niedertourig abzentrifugiert ( 30 Min., 2.200g ). Im Anschluß erfolgte die Sedimentation der Viruspartikel in einem Beckmann-Festwinkelrotor 45TI ( 90 Min., 40.000 Upm, 4 °C ). Das Sediment wurde über Nacht in 0,5 ml PBS eingeweicht, danach resuspendiert und mit Ultraschall behandelt. Nach erneuter niedertouriger Zentrifugation ( 10 Min., 2.200g ) wurde der Überstand auf einen linearen Sucrosegradienten ( 20 - 60%ig ( wt/wt ) in PBS ) aufgetragen und 150 Minuten bei 55.000 Upm in einem Beckmann SW-60-Rotor zentrifugiert. Die Abnahme der Virusbande erfolgte durch seitliche Punktion. Diese Fraktion wurde 1:10 verdünnt, wie oben beschrieben sedimentiert und bei -70 °C gelagert. Der Reinheitsgrad des Virusmaterials wurde im Elektronenmikroskop ( EM ) überprüft.

### 3.1.4. Serologische Untersuchungen

Zum Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen CPV-2 wurden der Hämagglutinationshemmungstest ( HAH ) und der ELISA verwendet.

#### 3.1.4.1. Hämagglutinationshemmungsreaktion ( HAH )

Alle Seren wurden zunächst für 30 Minuten bei 56 °C inaktiviert. Dann wurden sie über Nacht bei 4 °C auf

einem Schüttler an Schweineerythrozyten absorbiert und nachfolgend zur Abtrennung der Erythrozyten nidentourig zentrifugiert ( 5 Min., 1.200g ). 25 µl dieser Proben wurden in einer Mikrotiterplatte in NaCl-PP in log 2-Schritten verdünnt. Die jeweils oberste Vertiefung jeder Verdünnungsreihe diente als Serumkontrolle. Den restlichen Vertiefungen wurden 25 µl einer Virussuspension, die zuvor auf vier hämagglutinierende Einheiten ( HAU ) eingestellt worden war, zugegeben. Nach kräftigem Schütteln wurde zunächst für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert mit darauffolgender Abkühlung für 15 Minuten bei 4 °C. Der nächste Schritt bestand in der Zugabe von 50 µl einer 1%igen Schweineerythrozytenlösung und abermaligem Schütteln. Nach einstündiger Inkubation bei 4 °C konnte die Reaktion abgelesen werden. Als HAH-Titer wurde die höchste Serumverdünnung angegeben, bei der noch eine vollständige Hemmung der Hämagglutination eingetreten war. Ein positives und negatives Serum liefen bei jedem Test zur Kontrolle parallel.

#### 3.1.4.2. ELISA

Für den ELISA wurden 96-Loch Mikrotiterplatten ( Nunc, Immunolon II, Wiesbaden ) mit gereinigtem Virusmaterial beschichtet. Dazu wurde in Natriumkarbonat/Natriumbikarbonat-Puffer, pH 9,6, eine Virussuspension hergestellt, die 0,2 µg Protein pro ml enthielt. 100 µl dieser Suspension wurden in jede Vertiefung pipettiert und drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Platten waren nach mindestens zwölf Stunden Lagerung bei 4 °C im Test einsetzbar oder wurden bei -20 °C aufbewahrt.

### Durchführung des ELISA:

Die beschichteten Platten wurden viermal mit NaCl-PP, dem 0,05% Tween 20 zugesetzt war ( NaCl-PP-T ), gewaschen. In jede Vertiefung wurden 100 µl Waschpuffer vorgelegt und die Seren in log 2-Schritten verdünnt. Anschließend wurden die Platten bei 37 °C unter leichtem Schütteln für 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen wurden Mäuseantikörper direkt nachgewiesen, indem in jede Vertiefung 100 µl Kaninchen-Anti-Maus-Ig, Peroxidase ( POD ) markiert ( Dako, Hamburg ), pipettiert wurden. Die Gebrauchsverdünnung des Konjugates betrug 1:1000 in NaCl-PP mit 5% FKS. Zum Nachweis von Hühnerantikörpern mußte zunächst mit 100 µl Kaninchen-Anti-Huhn-IgG ( Sigma, 1:500 verdünnt in NaCl-PP mit 5% FKS ) beschichtet werden, bevor beim nächsten Schritt 100 µl POD-markiertes Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG ( Sigma, 1:1000 verdünnt in NaCl-PP mit 5% FKS ) in jede Vertiefung pipettiert wurden. Nach abschließender Inkubation und viermaligem Waschen wurden pro Loch 100 µl 3'-3'-5'-5'-Tetramethylbenzidine-Lösung ( TMB, Serva, Heidelberg ) als Indikator zugesetzt. Zur Verwendung von TMB als Indikator wurden folgende Stammlösungen benötigt:

0,2M Natriumacetat

0,2M Zitronensäure

TMB: 100 mg gelöst in 10 ml DMSO ( kann bei 4 °C gelagert werden )

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. ( 30%ig )

2M Schwefelsäure

Zur Durchführung wurden 9,9 ml Natriumacetat und 0,1 ml Zitronensäure mit 10 ml a. dest. und 0,2 ml TMB - Lösung gemischt. Kurz vor der Verwendung wurden 2,4 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben.

Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die enzymatische Reaktion mit 50 µl

2M Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion bei 450 nm gemessen. Als Kontrollen dienten positive und negative Seren bzw. Dotterproben.

### 3.1.5. Herstellung monoklonaler Antikörper gegen CPV-2

#### 3.1.5.1. Immunisierung von Mäusen

CPV-2-antikörperfreie weibliche Balb/C-Mäuse ( 15 Wochen alt ) wurden viermal im Abstand von jeweils vier Wochen mit 10.000 HAU einer über Sucrosegradienten gereinigten Virussuspension immunisiert. Bei den ersten beiden Immunisierungen wurde komplettes Freund'sches Adjuvans verwendet, bei den nachfolgenden beiden Immunisierungen inkomplettes Freund'sches Adjuvans. Die Immunantwort wurde mittels Serumuntersuchung ( HAH ) verfolgt und die Tiere mit dem höchsten Titer für die Fusion ausgewählt. Drei Tage vor der Fusion wurde noch einmal mit 5.000 HAU in 50 µl PBS intravenös reimmunisiert.

#### 3.1.5.2. Zellfusion

Die Fusion von Milzzellen immunisierter Mäuse mit Myelomzellen ( X63-Ag8.653 ) wurde nach Peters et al. ( 1985 ) durchgeführt. Der erste Test der Kolonien fand zehn Tage später statt. Zellkulturüberstände wurden sowohl im ELISA, wie auch in der HAH getestet, und nur mit Kolonien, die in beiden Tests ein positives Ergebnis erbrachten, wurde weitergearbeitet. Für die HAH mußten die Zellkulturüberstände der Kolonien 1:100 vorverdünnung werden, um unspezifische Reaktionen, hauptsächlich bedingt durch das enthaltene FKS, auszuschalten. Nachdem die fusionierten Zellen zunächst in 24-Loch-Platten eingesät worden waren, wurde danach zweimal durch limiting dilution in 96-Loch-Platten kloniert. Die positiven Klone wurden

vermehrt und von jedem Klon drei Balb\c-Mäuse mit je  $5 \times 10^6$  Zellen i.p. inokuliert. Die Klone wurden für die weitere Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert, der gewonnene Ascites bei  $-20^\circ\text{C}$ .

### 3.1.6. Immunisierung der Hühner

Für die Herstellung polyklonaler Antikörper wurden vier Hühner ( Weiße Leghorn, Lohmann, Cuxhafen ), die gerade zu legen begonnen hatten, mit CPV-2 immunisiert. 0,5 ml des sucrosegereinigten Virusmaterials mit 25.000 HAU wurden im Verhältnis 1:1 mit komplettem Freund'schen Adjuvans emulgiert und subkutan injiziert. Die erste Reimmunisierung erfolgte vier Wochen später, erneut unter Zusatz von komplettem Freund'schen Adjuvans. Eine zweite Reimmunisierung nach weiteren sechs Wochen wurde dann mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans durchgeführt.

### 3.1.7. Aufreinigung des Eidotters

Die Eier wurden täglich gesammelt und bis zur Aufreinigung bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Zur Abtrennung des Eidotters wurde dieser zunächst grob vom Eiklar befreit, dann auf ein Filterpapier gegeben und durch sorgfältiges Rollen von Eiweißresten befreit. Die Dotterhaut wurde angeschnitten und der Dotter in einem Gefäß aufgefangen, homogenisiert, anschließend lyophilisiert oder sofort mit verschiedenen Verfahren weiter behandelt.

#### 3.1.7.1. Isopropanolmethode ( Bade und Stegemann, 1984 )

Als Ausgangsmaterial diente frischer Dotter oder in PBS resuspendierter lyophilisierter Dotter. 10 ml Dottermaterial wurden mit 50 ml Isopropanol ( $-20^\circ\text{C}$ ) versetzt und gut geschüttelt. Der sich bildende Niederschlag wurde durch Zentrifugation

( 1000 g, 5 Min., 4 °C ) abgetrennt und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Danach wurde das Sediment mit 50 ml Aceton ( -20 °C ) versetzt und ansonsten verfahren wie oben. Nach einmaliger Wiederholung wurde das Sediment auf einen Buchnerfilter gegeben und mit einem Föhn getrocknet. Das so gewonnene Pulver wurde in 20 ml PBS aufgenommen und zwei Stunden bei 25 °C gerührt. Abschließend wurde die Lösung zentrifugiert ( 20.000g, 15 Min., 10 °C ), das Sediment verworfen und der Überstand weiter verwendet oder bei -20 °C eingefroren.

#### 3.1.7.2. Dextransulfatmethode ( Jensenius et al., 1981 )

10 ml Dotter wurden in 40 ml PBS aufgenommen und gut vermischt. Nach Abtrennung der groben Bestandteile durch Zentrifugation ( 2.200g, 10 Min., 15 °C ) wurden dem Überstand 3 ml Dextransulfat ( MG 500.000, Pharmacia, Freiburg, 10% wt/wt, in PBS ) sowie 7,5 ml 1M  $\text{CaCl}_2$  zugegeben und 30 Minuten bei 25 °C inkubiert. Nach Zentrifugation ( 5.000g, 10 Min., 15 °C ) wurde der Überstand aufbewahrt, das Sediment in 50 ml PBS aufgelöst und die Zentrifugation wiederholt. Die beiden Überstände wurden durch Zugabe von PBS auf ein Volumen von 100 ml ergänzt. Dieser Lösung wurden 100 ml gesättigte Ammoniumsulfatlösung zugesetzt und 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Der sich bildende Niederschlag wurde abzentrifugiert ( 10.000 g, 20 Min., 15 °C ) und das Pellet in 5 ml PBS resuspendiert.

#### 3.1.7.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ( Laemmli, 1970 )

Die Reinheit der verschiedenen Dotterpräparationen wurde in der SDS-Page überprüft. Hierzu wurden Gele mit einem Porengradienten von  $C = 3\% - 15\%$  verwendet. Die Elektrophorese erfolgte vertikal bei einer Strom-

stärke von 40 mA unter nicht reduzierenden Bedingungen. Die Proben wurden 1:100 in Probenpuffer verdünnt und von dieser Lösung jeweils 50 µl auf das Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele eine Stunde in Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung gefärbt und anschließend der Hintergrund über Nacht entfärbt. Als Molekulargewichtsmarker wurden SDS 7B ( Sigma, München ) sowie Hühner-IgG verwendet.

#### 3.1.7.4. Quantitative Bestimmung von Hühner-IgG

Diese Fragestellung wurde mit der Rocket-Immunelektrophorese ( Laurell, 1966 ) überprüft und diese nach Standardverfahren durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Feldstärke von 1 Volt/cm. Als Standard wurde Hühner-IgG ( Sigma, München ) in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Die Länge der Immunpräzipitate wurde gemessen und mit Hilfe der linearen Regression eine Eichgerade errechnet. An dieser konnten die IgG-Konzentrationen der Dotterpräparationen ermittelt werden.

#### 3.1.8. In vitro-Untersuchungen über die Resistenz von Dotter-AK

##### 3.1.8.1. Säurebehandlung

Pufferlösungen mit einem pH von 2,2, 4,0 und 5,6 wurden nach McIlvaine ( 1921 ) hergestellt. In jeweils 10 ml dieser Pufferlösungen wurden 1 g lyophilisierter Dotter aufgelöst. Die Lösungen wurden in zwei Ansätzen je 0,5 bzw. 2,0 Stunden bei 37 °C inkubiert, wieder auf neutralen pH-Wert hochgepuffert und anschließend in der HAH und im ELISA auf ihre Anti-CPV-2-Aktivität überprüft. Vor der Durchführung der HAH wurden die Proben inaktiviert und über Nacht an Schweineerythrozyten absorbiert. Als Positivkontrolle

diente der eingesetzte lyophilisierte Dotter in neutraler Lösung.

### 3.1.8.2. Behandlung mit Trypsin und Chymotrypsin

Zuerst wurde eine Dotterlösung hergestellt, die 0,5 g Dotter pro 10 ml NaCl-PP enthielt. Je dreimal 1 ml dieser Dotterlösung wurden 63 BAEE Einheiten Trypsin ( Serva, Heidelberg ) sowie 300 Einheiten Chymotrypsin ( Sigma, München ) zugesetzt und für 10, 30 bzw. 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Jeweils am Ende der Inkubationszeit wurden den Lösungen 408 BTEE Einheiten eines Trypsin/Chymotrypsin-Inhibitors ( Sigma, München ) zugegeben. Dies reichte aus, die enzymatische Reaktion zu stoppen. Die Dotter-AK wurden anschließend ebenfalls wieder in der HAH nach der üblichen Vorbehandlung und im ELISA getestet.

### 3.1.9. In vivo-Untersuchungen über die Resistenz von Dotter-AK

Beagle im Alter von 2-5 Monaten wurden getrennt voneinander in Zwingern gehalten. Gefüttert wurden sie zweimal täglich mit Dosenfutter und Hundeflocken. Zur Untersuchung der in vivo-Verdauung von Hühner-AK wurde ihrem Futter lyophilisierter Dotter mit Anti-CPV-2-Aktivität sowie verschiedene Zusätze über mehrere Tage beigemischt. Die Kotproben wurden regelmäßig gesammelt und auf ihren Gehalt an Anti-CPV-2-AK untersucht.

#### 3.1.9.1. Verabreichung der AK

Im ersten Versuch wurden lediglich 5 g lyophilisierter Dotter pro Mahlzeit unter das Futter gemischt. Im darauffolgenden Versuch wurde die Dottermenge auf 7 g erhöht und zur Pufferung des Magensaftes 2 g Bikarbonat zugefüttert. Zusätzlich wurde die protektive Wirkung von Eiklar, Polyvinylpyrrolidon ( PVP, Serva,

Heidelberg, MG 25.000 ) bzw. eine Kombination aus beiden überprüft. Dazu erhielt eine Gruppe pro Mahlzeit ein Eiklar ( = 10 g ). Einer weiteren Gruppe wurden pro Mahlzeit 7 g PVP verabreicht. Dazu wurden 7 g PVP und 7 g Dotter vermischt, 20 ml NaCl-PP zugegeben, kräftig geschüttelt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Im nächsten Versuch wurden jeder Mahlzeit sowohl ein Eiklar wie auch 7 g PVP zugegeben. Die Dotter- und die Bikarbonatmenge blieben konstant.

In einem abschließenden Versuch wurde das Dottermaterial verkapselt. Dazu wurden dünndarmlösliche Gelatinekapseln ( 0,5 bzw. 0,75 cm<sup>3</sup> ) mit lyophilisiertem Dotter befüllt. Die Kapseln faßten 0,7-0,8 g Dottermaterial. Den Hunden wurden acht Kapseln pro Mahlzeit verabreicht, was einer Dottermenge von ungefähr 6 g entspricht. Zusätzlich wurde wiederum ein Eiklar pro Mahlzeit gefüttert.

#### 3.1.9.2. Nachweis von Antikörpern gegen CPV-2 bzw. von Hühner-AK in Kotproben

Der Kot wurde 1:5 in NaCl-PP verdünnt, gründlich gemischt und zur Abtrennung der unlöslichen Bestandteile niedertourig zentrifugiert ( 2.200g, 30 Min. ). Der pH wurde durch Zugabe von 1M Karbonatlösung auf pH 7,0-7,4 hochgepuffert. Anschließend wurden die Überstände in der HAH und im ELISA zum Nachweis von CPV-2-AK und Hühner-AK getestet. Vor der HAH wurden die Proben wie oben beschrieben inaktiviert und über Nacht an Schweineerythrozyten absorbiert. Die Tests wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

#### 3.1.9.3. ELISA zum Nachweis von Hühner-IgG im Kot.

Für diesen Test wurden Immunolon-II-Platten mit 1:100 in NaCl-PP verdünntem Kaninchen-Anti-Huhn-IgG

( Sigma, München ) beschichtet. Das Waschen der Platten und die Serumverdünnungen wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Als Konjugat wurde Kaninchen-Anti-Huhn-IgG, POD-markiert, in einer Verdünnung von 1:1000 in NaCl-PP mit 5% FKS verwendet. Alle weiteren Schritte entsprachen oben beschriebenen.

#### 3.1.9.4. Hemm-ELISA

In diesem Test wurden dieselben CPV-2-beschichteten Immunolon-II-Platten verwendet wie im Anti-CPV-2-ELISA. Von den zu untersuchenden Kotproben wurden je 100 µl Überstand in die oberste Vertiefung einer zweiten, unbeschichteten Platte pipettiert und in log 2-Schritten in NaCl-PP-T verdünnt. Danach wurden in jede Vertiefung 100 µl einer Dotter-AK-Lösung in einer 1:500 Verdünnung zugegeben, die zuvor im Anti-CPV-2-ELISA getestet worden war und dabei eine Extinktion von 0,400 aufgewiesen hatte. Die Platte wurde anschließend geschüttelt und der Inhalt einer jeden Vertiefung komplett auf die CPV-2-beschichtete Platte überführt. Diese Platte wurde für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Konjugatzugabe und alle weiteren Schritte erfolgten wie beim Anti-Hühner-IgG-ELISA beschrieben. Die Hemmung wurde anhand der Extinktionsabnahme gegenüber der standardisierten AK-Lösung bestimmt.

### 3.2. Ergebnisse

#### **3.2.1. Virusvermehrung und Reinigung**

Das Saatvirus Ka/Be hatte nach der ersten Passage auf MDCK - Zellen einen HA-Titer von 1:16, der Zellrasen zeigte jedoch keinen cpE. Deshalb wurde das Virus fünfzehnmal passagiert. Danach war der HA-Titer bis auf 1:512 angestiegen und bis zum fünften Tag nach der Virusinokulation war auch meist ein cpE erkennbar, der allerdings nicht immer gleich deutlich ausgeprägt war.

Bei der Reinigung im Sucrosegradienten zeigten sich regelmäßig zwei Virusbanden. Bei der unteren Bande wurden im EM massenhaft komplette Viruspartikel nahezu ohne Verunreinigungen gesehen. Die obere Bande enthielt dagegen weniger Parvovirionen bei einem wesentlich geringeren Reinheitsgrad. Beide Virusbanden wiesen jedoch denselben HA-Titer von 1:10.000 auf. Die untere Bande wurde daher für die Immunisierung der Hühner und der Mäuse sowie zur Plattenbeschichtung für den Anti-CPV-2-ELISA verwendet. Bei der Plattenbeschichtung ergaben sich allerdings keine Unterschiede, wenn die obere Bande verwendet wurde. Sie wurde aber sicherheitshalber nicht in den Tests eingesetzt.

#### **3.2.2. Herstellung monoklonaler Antikörper**

Die Immunisierung der Mäuse mit CPV-2 löste bei diesen eine gute Immunantwort aus, die deutlich von der Virusmenge abhing, mit der immunisiert wurde. So entwickelten Tiere, die mit 10.000 HAU pro Dosis immunisiert worden waren, einen HAH-Titer von 1:6.400 bis 1:25.600 im Serum, während Tiere, die nur mit 1.000 HAU pro Dosis immunisiert worden waren, auch nur einen HAH-Titer von 1:800 bis 1:3.200 aufwiesen.

Mäuse mit der besten Immunantwort wurden für die Fusion verwendet.

Es wurden insgesamt vier Fusionen durchgeführt, von denen eine bakteriell kontaminiert war. Bei den anderen Fusionen zeigte sich in fast allen Vertiefungen ein Wachstum von Kolonien. Zehn Tage nach Durchführung der jeweiligen Fusion wurden die Zellkulturüberstände zum ersten Mal im ELISA und in der HAH getestet. Dabei wurden nur bei einer Fusion zwei deutlich positive Primärkolonien gefunden, deren Überstände Extinktionen von über 1,0 im ELISA aufwiesen. Nur eine dieser Kolonien war dann auch in der HAH positiv. Sie wies einen HAH-Titer von 1:160 auf. Beide Kolonien wurden auf ihre Kreuzreaktion mit unbeschichteten Immunoplaten und mit nicht infizierten MDCK-Zellen beschichteten Platten hin überprüft. Zellkulturüberstände beider Kolonien zeigten keine unspezifischen Reaktionen. Die positiven Primärkolonien wurden zweimal mit der Limiting-dilution-Technik in 96-Loch-Platten kloniert, die Zellkulturüberstände wiederum ausgetestet und die jeweils besten Klone ausgewählt. Drei in der HAH und im ELISA positive Klone ( 3C3-1D6-C9, 3C3-1D6-F2, 3C3-1D6-G10 ) und ein nur im ELISA positiver Klon ( 3D1-2D6-E3 ) wurden vermehrt und von jedem Klon mehrere Ampullen ( mit jeweils  $3,75 \times 10^5$  Zellen/ml ) in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. In jeweils drei Balb/C-Mäuse, die mit Pristan vorbehandelt worden waren, wurden je  $5 \times 10^6$  Zellen der in der HAH positiven Klone inokuliert. Nach zehn bis vierzehn Tagen produzierten die Mäuse bis zu 25 ml Aszites. Dieser wurde inaktiviert, über Nacht an Schweineerythrozyten absorbiert und dann in der HAH getestet. Dabei wiesen die beiden Klone 3C3-1D6-C9 und 3C3-1D6-F2 einen HAH-Titer von 1:32.000 auf, der Klon 3C3-1D6-G10 einen HAH-Titer

von 1:6.400. Zur Lagerung wurde der Aszites bei -20 °C eingefroren.

Nach diesen Ergebnissen wurde mit den monoklonalen AK nicht mehr weitergearbeitet, da in Zellkultur nur ein HAH-Titer von 1:160 erreicht wurde. Eine Produktion der benötigten Menge an spezifischen AK in der Bauchhöhle von Mäusen ist ethisch nicht zu vertreten. Deshalb konzentrierten wir uns ab diesem Zeitpunkt auf polyklonale Dotter-AK, die paralell hergestellt wurden.

### **3.2.3. Immunisierung der Hühner und Aufreinigung des Eidotters**

Die Immunantwort der Hühner wurde anhand ihres AK-Gehaltes mit Anti-CPV-2-Aktivität im Eidotter in der HAH und im ELISA verfolgt. Zusätzlich wurde der IgG-Gehalt quantitativ in der Rocket-Immunelektrophorese bestimmt. Dazu wurden die Eier täglich gesammelt und in Chargen von jeweils vierzehn Tagen lyophilisiert. Das Lyophilisieren des Dotters war aus zweierlei Gründen von Vorteil. Zum einen war er länger lagerfähig. Zum anderen verwandelt sich eingefrorener Dotter nach dem Auftauen in eine zähe Masse, die weder aus einer Flasche ausfließt, noch ohne große Verluste zu portionieren ist. Bei der weiteren Aufarbeitung war kein Nachteil durch die Lyophilisierung feststellbar, es mußte lediglich der Gewichtsverlust des Dotters von 50% berücksichtigt werden. Deshalb wurden die Proben nach den Aufreinigungen auf ihr ursprüngliches Volumen gebracht. Die Aufreinigungen wurden vor allem deshalb durchgeführt, weil befürchtet wurde, lyophilisierter Dotter würde bei den AK-Nachweisverfahren zu unspezifischen Reaktionen führen. Diese Vermutungen wurden allerdings nicht bestätigt.

Die Reinheit der Proben nach der Dextransulfat- und der Isopropanolaufreinigung wurde in der SDS-Page überprüft. Dabei zeigten die Proben, die mit der Dextransulfat-Methode hergestellt worden waren, eine deutliche Bande, die der Hühner-IgG-Bande entsprach, die als Standard mitgetestet wurde. Ansonsten waren nur noch einige schwache Banden im höheren Molekularbereich sichtbar. Bei der Isopropanolaufreinigung waren zusätzlich zur IgG-Bande noch mehrere deutliche Banden sichtbar, die Verunreinigungen anzeigten. Die Dextransulfatmethode stellte somit die am besten geeignete Methode zur präparativen Darstellung von IgG aus Dotter dar.

Lyophilisierter Dotter von Chargen, die aus der 3., 5., 10., 25. und 34. Woche nach der ersten Immunisierung, sowie Dotter, der vor der Immunisierung gewonnen worden war, wurde nach Auflösung in NaCl-PP bzw. nach Aufreinigung mit der Isopropanol- bzw. Dextransulfatmethode in der HAH und im ELISA überprüft.

Dotterproben nicht immunisierter Hennen waren in der HAH negativ. Im ELISA zeigten sich aber bis zu einer Verdünnung von 1:4000 unspezifische Reaktionen. Zum Zeitpunkt der dritten Woche nach der ersten Immunisierung wiesen sämtliche Dotterproben deutliche AK-Titer auf. Der HAH-Titer der untersuchten Dotterproben lag bei 1:6.400, lediglich nach der Isopropanolaufreinigung lag er bei nur 1:3.200. Im ELISA wiesen die Proben bei einer Verdünnung von 1:16.000 Extinktionen von 0,500 - 0,600 auf. Nach Isopropanolaufreinigung wurde dagegen nur eine Extinktion von 0,220 erreicht.

Nach der Reimmunisierung stieg der HAH-Titer auf 1:12.800 an, während die Extinktion im ELISA nur auf einen Wert von maximal 0,792 anstieg. Eine weitere

Reimmunisierung hatte dagegen keinen signifikanten Einfluß mehr auf den AK-Gehalt.

Die Bestimmung des IgG-Gehaltes von lyophilisiertem Dottermaterial ergab einen Gehalt von 14-19 mg/ml. Dabei war kein Unterschied des IgG-Gehaltes vor und nach der Immunisierung feststellbar. Nach der Isopropanolaufreinigung wurden noch IgG-Gehalte von 10-12,5 mg/ml, nach der Dextransulfataufreinigung von 12,5-15,5 mg/ml gefunden. Auch hier hatte die Immunisierung keinen Einfluß auf den IgG-Gehalt. Dies entspricht einem Verlust an IgG von etwa 30% bei der Isopropanolaufreinigung und von ungefähr 15% bei der Dextransulfataufreinigung. Diese höheren Verluste bei der entsprechenden Methode erklären auch die geringeren HAH-Titer und ELISA-Extinktionen.

Die Ergebnisse der Entwicklung des AK-Gehaltes im Dotter nach der Immunisierung sowie die AK-Gehalte nach den zwei Aufreinigungsverfahren sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengefaßt.

### **3.2.4. In vitro-Untersuchungen über die Resistenz von Dotter-AK**

#### **3.2.4.1. Säurebehandlung**

Die Säurebehandlung führte zu einem deutlich pH-abhängigen Abfall des HAH-Titers. Bei den Dotterproben, die bei einem pH von 5,6 bzw. 4,0 inkubiert worden waren, zeigte sich ein Abfall des HAH-Titers von 1:12.800 auf nur 1:10.240. Nach der Inkubation bei einem pH-Wert von 2,2 fiel der HAH-Titer auf einen Wert von 1:2.560. Die unterschiedlichen Inkubationszeiten von 0,5 und 2,0 Stunden hatten dabei keinen Einfluß auf den AK-Titer. Im Anti-CPV-2-ELISA war der AK-Aktivitätsverlust nicht nachvollziehbar. Nach der Säurebehandlung unterschieden sich die Extinktionen

| Zeitpunkt<br>nach Immun. | Behandlungsverfahren |             |                    |
|--------------------------|----------------------|-------------|--------------------|
|                          | Lyophilisierung      | Isopropanol | Dextran-<br>sulfat |
| 3 Wo.                    | 17,7                 | 10,1        | 15,5               |
| 5 Wo.                    | 16,5                 | 10,3        | 15,7               |
| 10 Wo.                   | 16,9                 | 10,9        | 12,7               |
| 25 Wo.                   | 15,5                 | 11,7        | 14,3               |
| 34 Wo.                   | 14,1                 | 12,5        | 13,9               |

Tabelle 1: Antikörpergehalt des Dotters nach verschiedenen Behandlungsverfahren in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach der Immunisierung (Angaben in mg/ml; ermittelt in der Rocketimmunelektrophorese).

| Zeitpunkt<br>nach Immun. | Behandlungsverfahren |             |                    |   |
|--------------------------|----------------------|-------------|--------------------|---|
|                          | Lyophilisierung      | Isopropanol | Dextran-<br>sulfat |   |
| 3 Wo.                    | 6400                 | 3200        | 6400               | H |
|                          | 0,655                | 0,220       | 0,529              | E |
| 5 Wo.                    | 12800                | 3200        | 12800              | H |
|                          | 0,466                | 0,345       | 0,560              | E |
| 10 Wo.                   | 12800                | 12800       | 12800              | H |
|                          | 0,792                | 0,438       | 0,560              | E |
| 25 Wo.                   | 12800                | 12800       | 12800              | H |
|                          | 0,715                | 0,574       | 0,543              | E |
| 34 Wo.                   | 12800                | 12800       | 12800              | H |
|                          | 0,727                | 0,565       | 0,614              | E |

Tabelle 2: Antikörpergehalt des Dotters nach verschiedenen Behandlungsverfahren in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach der Immunisierung. Angegeben sind die reziproken Werte des HAH-Titers (H) und die Extinktionen (E) im Anti-CPV-2-ELISA bei einer Verdünnung der Seren von 1:16000

der einzelnen Dotterproben nur unwesentlich von denen der Positivkontrolle.

#### 3.2.4.2. Behandlung mit Trypsin/Chymotrypsin

Die Behandlung mit Proteasen wurde über eine Zeitdauer von 10, 30 bzw. 60 Minuten durchgeführt. Nach einer Behandlungsdauer von 10 und 30 Minuten fiel der HAH-Titer in beiden Fällen von 1:12.800 auf 1:9.600. Eine Behandlungsdauer von 60 Minuten führte zu einem Abfall des HAH-Titers auf 1:4.800. Auch im Anti-CPV-2-ELISA war ein deutlicher Abfall der Extinktionen der behandelten Proben im Vergleich zur Positivkontrolle feststellbar. Hier nahmen die Extinktionen der Proben bei einer Verdünnung von 1:4.000 von 0,918 auf 0,394 nach einer Behandlung von zehn Minuten ab. Nach einer Behandlungsdauer von 30 Minuten kam es zu einer weiteren Reduktion auf einen Extinktionswert von 0,231. Dieser Wert stellte das Minimum dar; auch nach 60-minütiger Inkubation wurde mit 0,259 ein ähnlicher Wert gemessen.

Die Werte der HAH-Titer nach beiden Behandlungsmethoden sind in Abbildung 1 graphisch dargestellt. Die unterschiedlichen Reaktionen im Anti-CPV-2-ELISA nach den zwei Behandlungsverfahren werden in den Abbildungen 2 und 3 deutlich gemacht.

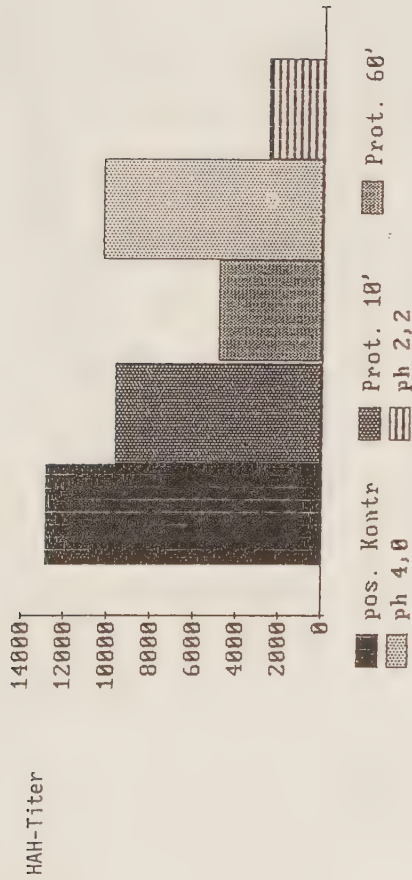


Abbildung 1: Säurebehandlung und Trypsin/Chymotrypsinbehandlung von Dotter-Ak.  
 Angegeben sind die reziproken Werte der HAH-Titer nach den verschiedenen Behandlungen.  
 Prot. 10' und Prot. 60' : Behandlung mit Proteasen über 10 bzw. 60 Minuten.  
 pH 2,2 und pH 4,0 : Behandlung mit Säure bei den entsprechenden pH-Werten über  
 eine Zeitdauer von 2 Stunden.

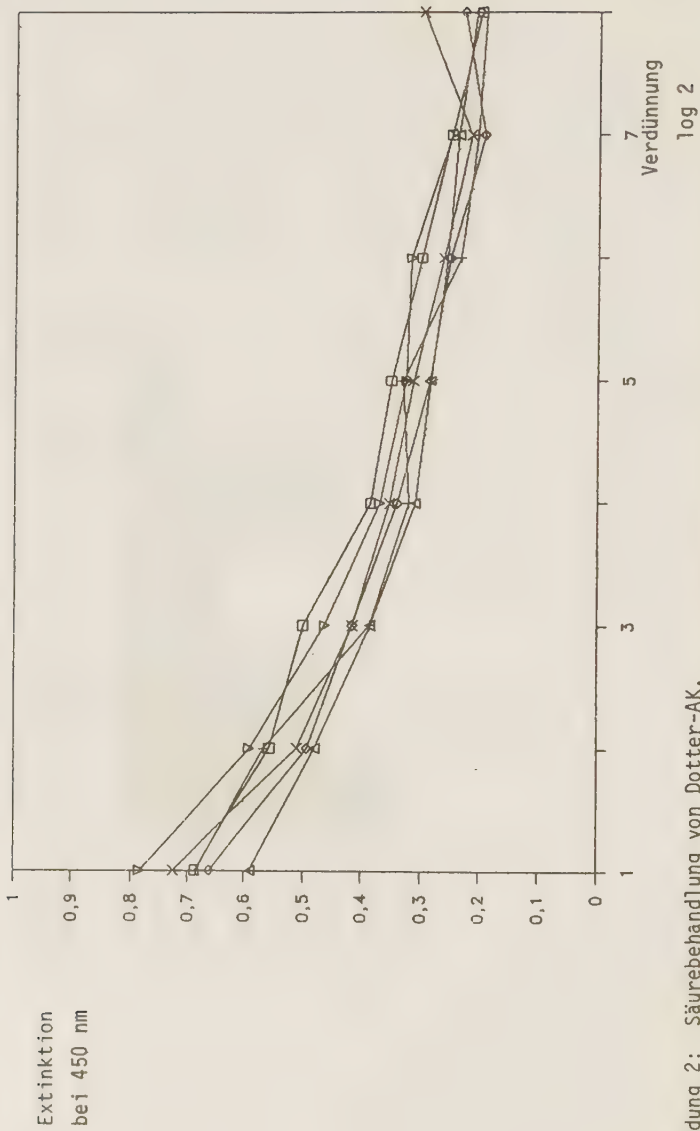


Abbildung 2: Säurebehandlung von Dotter-AK.

Angegeben sind die Extinktionen im Anti-CPV-2-ELISA bei einer Verdünnung der Proben von 1:4.000.

▽ pos. Kontr. × pH 5,6 ü. 2 Std. △ pH 4,0 ü. 2 Std.

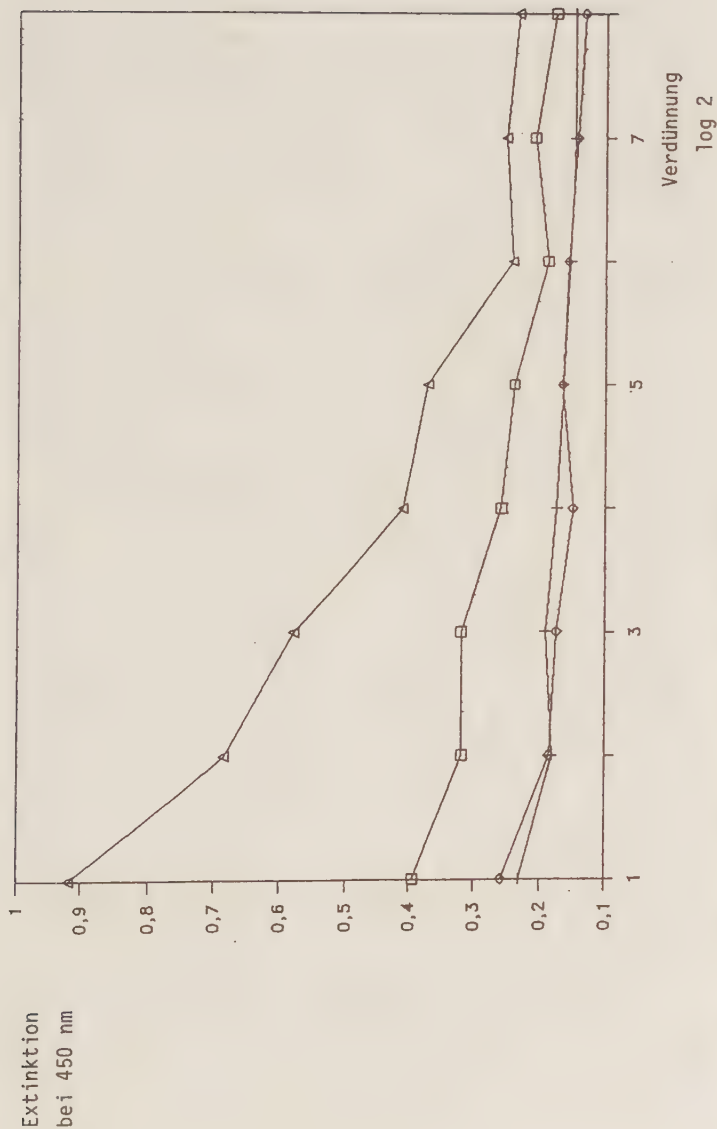


Abbildung 3:

Trypsin/Chymotrypsinbehandlung von Dotter-AK.

Angegeben sind die Extinktionen im Anti-CPV-2-ELISA bei einer Verdünnung der

Proben von 1:4.000.

△ pos. Kontr. □ Behandl. dauer 10 Min. + Behandl. dauer 30 Min. ◇ Behandl. dauer 60 Min.

### 3.2.5. In vivo-Untersuchungen über die Resistenz von Dotter-AK

#### 3.2.5.1. Haltung und Fütterung der Hunde

Die Fütterungsversuche wurden mit einer Gruppe von fünf Beagles durchgeführt. Vier der Hunde stammten aus einem Wurf und hatten zu Beginn der Fütterungsversuche ein Alter von vier Monaten und ein Gewicht von durchschnittlich 10 kg. Diese Hunde stammten aus einem Zuchtbetrieb, in dem Parvovirose endemisch war und waren zum Zeitpunkt ihrer Ankunft akut an Parvovirose erkrankt. Deshalb wurde erst zwei Monate später mit den Fütterungsversuchen begonnen. Der fünfte Hund war drei Monate alt und wog 5 kg. Er stammte aus einer CPV-2-freien Zucht, war aber im Rahmen eines Infektionsversuches mit CPV-2 infiziert worden. Auch bei diesem Hund wurden bis zum Beginn der Fütterungsversuche sechs Wochen abgewartet. Sämtliche Hunde wiesen zu Beginn der Versuche HAH-Titer zwischen 1:320 und 1:2.560 im Serum auf und schieden mit dem Kot kein CPV-2 mehr aus. Für die Fütterungsversuche wurden zwei bzw. drei Tiere zufällig für eine Versuchsgruppe ausgewählt und während der Versuchsdurchführung einzeln gehalten, um die Kotproben nach Tier getrennt sammeln zu können. Nach jedem Fütterungsversuch wurde eine Pause von mindestens zwei Wochen vor Beginn eines weiteren eingefügt, in der die fünf Hunde in einem gemeinsamen Zwinger gehalten wurden. Die Tiere wurden über den gesamten Zeitraum der Versuchsdurchführung mit Dosenfutter und Hundeflocken zweimal täglich gefüttert. Der lyophilisierte Dotter sowie die jeweiligen Zusätze wurden dem Futter zugemischt und unter Wasserzugabe zu einem Brei verrührt. Bei keinem der Fütterungsversuche kam es zu einer erkennbaren Beeinträchtigung der Verdauung der Hunde.

Es waren weder ein gestörtes Allgemeinbefinden, Appetitlosigkeit noch Durchfall feststellbar.

### 3.2.5.2. Untersuchung der Kotproben in der HAH und im ELISA

Nach der Verdünnung in NaCl-PP und der Zentrifugation wiesen die Kotproben häufig noch einen trüben Überstand auf, der vermutlich von mukösen Bestandteilen des Kotes herrührte. Es stellte sich als günstig heraus die Kotproben vor einer weiteren Zentrifugation zuerst zu inaktivieren. Dies unterstützte den Sedimentationsvorgang. Nur Proben, die einen klaren Überstand zeigten, waren in der HAH auswertbar. Alle anderen führten zu einer Isoagglutination der Schweineerythrozyten.

Zusätzlich mußte bei allen Überständen der pH-Wert kontrolliert werden, da sämtliche Kotproben, die einen pH von unter 6,8 aufwiesen, zu einer Isoagglutination der Schweineerythrozyten führten. Deshalb mußte jede Kotprobe im pH-Meter gemessen werden und der pH auf einen Wert von 6,8 bis 7,2 eingestellt werden. Dabei zeigte sich nach der Zufütterung von Bikarbonat ein pH-Anstieg von Werten um pH 5,5 vor dem Bikarbonatzusatz auf fast neutrale Werte. Nach Zufütterung von PVP verblieben die pH-Werte der Kotproben trotz Bikarbonatzusatzes allerdings im sauren Bereich.

Sämtliche Kotproben wurden zunächst in der HAH und im Anti-CPV-2-ELISA getestet. Dabei stellte sich heraus, daß Proben, die einen positiven HAH-Titer aufwiesen, im Anti-CPV-2-ELISA keine spezifische Reaktion zeigten. Deshalb wurden die Kotproben anschließend im Hemm-ELISA getestet. Zwar waren sie in der Lage, eine standardisierte Hühner-IgG-Lösung zu hemmen, doch war dies auch bei Kotproben zu beobachten, die keine

Dotter-AK enthalten konnten. Zudem konnte mit diesem Test nicht zwischen Hunde- und Hühner-AK unterschieden werden. Deshalb wurden die Kotproben im Anti-Hühner-IgG-ELISA untersucht. Dieser Test war sehr empfindlich. Lyophilisierter Dotter in einer 1:160.000 Verdünnung ergab eine Extinktion von über 2,0. In diesem Test erzielten sämtliche Kotproben ( in einer Verdünnung von 1:1000 in NaCl-PP-T ), die einen positiven HAH-Titer aufwiesen, Extinktionen von über 1,0. Keine der Kotproben, die von Zeitpunkten vor oder nach der AK-Fütterung stammten und somit keinen Dotter-AK enthalten konnten, wies eine höhere Extinktion als 0,200 auf. Die Ergebnisse der HAH deckten sich vollständig mit denen des ELISAs.

Bei allen Fütterungsversuchen, bei denen AK im Kot nachgewiesen werden konnten, wurden diese erstmals 15-24 Stunden nach der ersten Gabe von Dotter-AK gefunden. Für dieselbe Zeitdauer hielt die AK-Ausscheidung nach der letzten AK-Fütterung noch an.

#### 3.2.5.3. Fütterung von lyophilisiertem Dotter

Drei Hunden wurde über fünf Tage hinweg 5 g lyophilisierter Dotter in Pulverform zu jeder Mahlzeit zugesetzt und gründlich vermischt. Aus organisatorischen Gründen konnten nur ein bis zwei Kotproben pro Tag von jedem Tier gesammelt werden. Insgesamt wurden 22 Kotproben gesammelt und untersucht. Keine dieser Proben wies einen positiven HAH-Titer auf oder zeigte im Anti-Hühner-IgG-ELISA eine Extinktion von über 0,500.

#### 3.2.5.4. Fütterung von lyophilisiertem Dotter, Eiklar und Bikarbonat

Zwei Hunden wurde über drei Tage hinweg jeder Mahlzeit 7 g lyophilisierter Dotter und 2 g Bikarbonat in Pulverform zugefüttert. Zusätzlich wurde noch jeder

Mahlzeit ein Eiklar zugesetzt. Sämtliche Kotproben wurden getrennt gesammelt und untersucht. Von den 23 gesammelten Kotproben wiesen vier Proben in der HAH einen Titer von 1:80 und zwei Proben einen Titer von 1:160 auf. Im ELISA war bei 10 Proben eine Extinktion von über 0,500 zu finden. Die ersten Kotproben, die AK enthielten, wurden 24 Stunden nach Fütterungsbeginn gefunden.

#### 3.2.5.5. Fütterung von lyophilisiertem Dotter, PVP und Bikarbonat

Hier wurden zunächst 7 g Dotter und 7 g PVP über Nacht inkubiert. Zwei Hunde bekamen über drei Tage jeweils 14 g der Mischung und 2 g Bikarbonat jeder Mahlzeit zugefüttert. Es wurden insgesamt 19 Einzel-Kotproben gesammelt. Dabei zeigten sechs Proben einen HAH-Titer von 1:40 und elf Proben im ELISA eine Extinktion von über 0,500. Die erste Dotter-AK enthaltende Kotprobe wurde 24 Stunden nach Fütterungsbeginn gefunden.

#### 3.2.5.6. Fütterung von verkapseltem lyophilisiertem Dotter und Eiklar

Drei Hunden wurde über fünf Tage hinweg jeder Mahlzeit ein Eiklar sowie lyophilisierter Dotter in dünndarmlöslichen Kapseln zugefüttert und die Kotproben eines jeden Hundes getrennt gesammelt und untersucht. Dazu wurden das Futter und das Eiklar zu einem Brei verrührt und die Kapseln unter den Futterbrei gemischt. Da die Hunde das breiige Futter schlangen und nicht bissen, war diese Verabreichungsform die günstigste. Um auf eine gleiche Dottermenge wie in den vorhergegangenen Versuchen zu kommen, mußten acht Kapseln pro Mahlzeit gefüttert werden. Es wurde niemals eine Kapsel im leeren Futternapf wiedergefunden und nur einmal während des Fressens eine in der Mitte

durchgegebissene Kapsel beobachtet, die aber selbst in diesem Fall den Dotter noch schützte, da der Dotter fest in die Kapseln gepresst war.

Insgesamt wurden 83 Kotproben gesammelt. Von diesen Proben wiesen sechs einen HAH-Titer von 1:20, eine einen HAH-Titer von 1:40 und eine einen HAH-Titer von 1:160 auf. Im ELISA zeigten 27 Proben eine Extinktion von über 0,500. Die erste Dotter-AK enthaltende Kotprobe wurde 24 Stunden nach Fütterungsbeginn gefunden.

#### 3.2.5.7. Fütterung von lyophilisiertem Dotter, Eiklar, PVP und Bikarbonat

Die Versuchsgruppe bestand wiederum aus drei Hunden, und die Zeitdauer des Versuches betrug fünf Tage. Allerdings bestand die Zufütterung bei diesem Versuchsansatz aus 2 g Bikarbonat sowie 7 g Dotter und 7 g PVP (hergestellt wie in 3.2.5.4). Gleichzeitig wurde noch ein Eiklar mit verabreicht. Von jedem Tier wurden Kotproben getrennt gesammelt und untersucht. Insgesamt wurden 60 Kotproben gesammelt. Von diesen wiesen eine Probe einen HAH-Titer von 1:20, sieben Proben einen HAH-Titer von 1:40, dreizehn Proben einen HAH-Titer von 1:80 und acht Proben einen HAH-Titer von 1:160 auf. Der ELISA bestätigte diese Ergebnisse. Hier zeigten 48 Proben eine Extinktion von über 0,500, wobei bei der Mehrzahl der Proben die Extinktion über 1,0 lag. AK enthaltende Kotproben wurden bereits fünfzehn Stunden nach Fütterungsbeginn gefunden.

Die HAH-Titer der untersuchten Kotproben nach Zufütterung der verschiedenen Dotter-AK-Präparationen sowie deren Extinktionen im Anti-Hühner-IgG-ELISA sind in den Abbildungen 4, 5, 6, 7 und 8 dargestellt.

# HAH-Titer Log 2

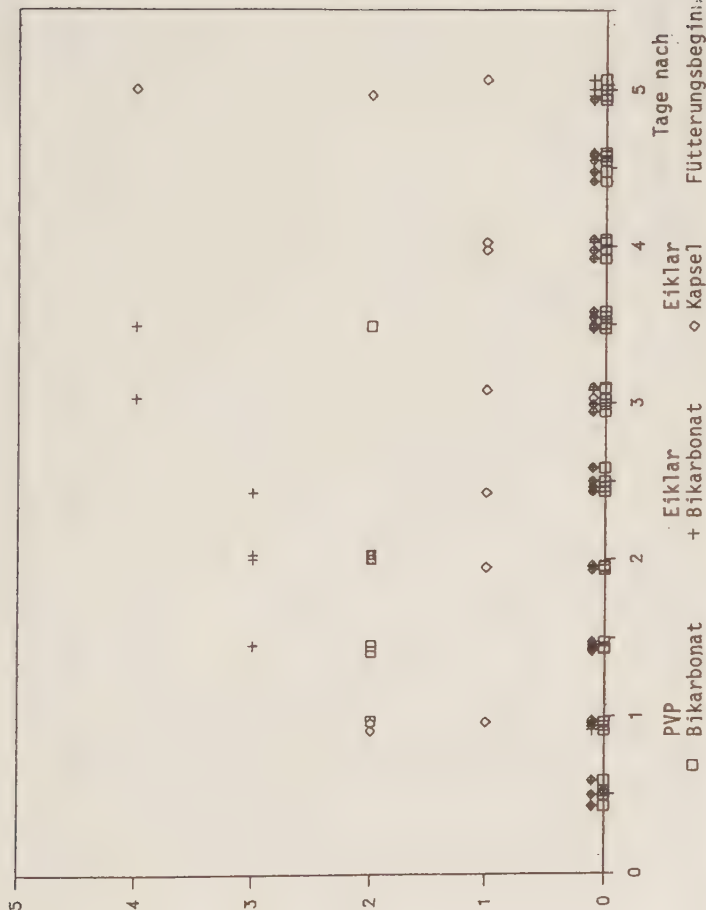


Abbildung 4: Antikörpergehalt von Kotproben nach Zufütterung von lyophil. Dotter, Bikarbonat und PVP sowie von Dotter in verkapselter Form und Eiklar. Angegeben sind die HAH-Titer in Abhängigkeit der Fütterungstage. Die Zu fütterung von lyophil. Dotter, Bikarbonat und PVP bzw. Eiklar erfolgte über 3 Tage, die Zufütterung von verkapseltem Dotter und Eiklar über 5 Tage.

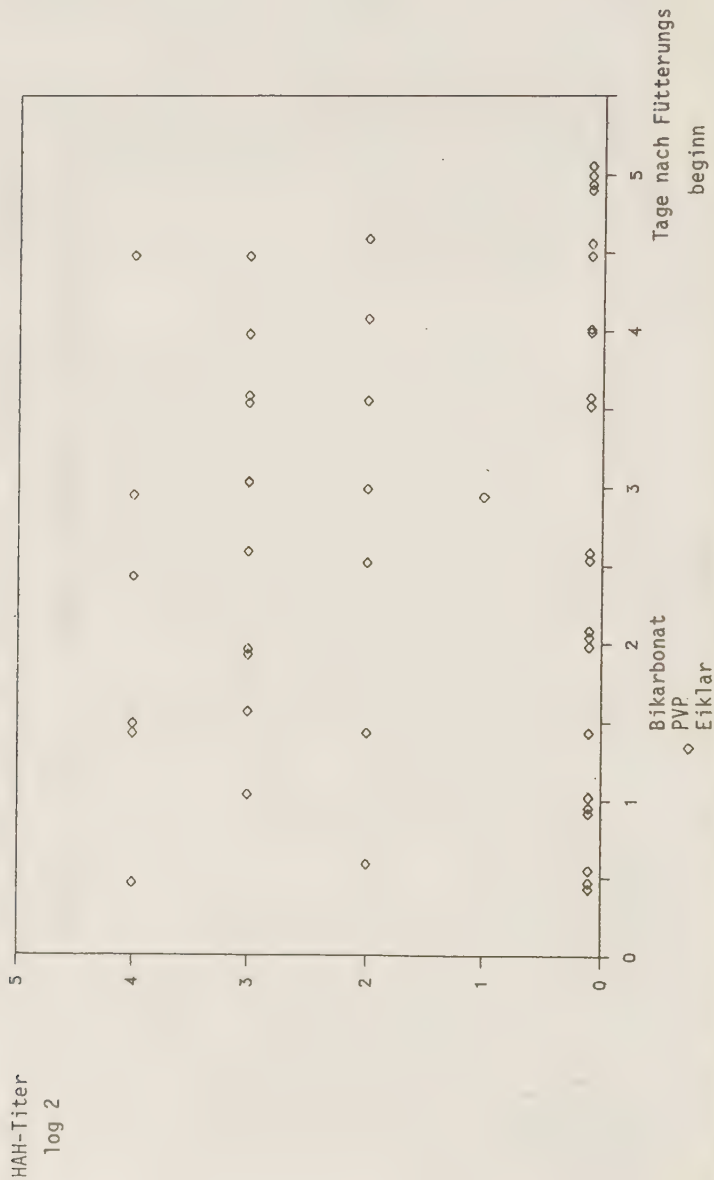


Abbildung 5: Antikörpergehalt von Kotproben nach Zufütterung von lyophil. Dotter, Bikarbonat, PVP und Eiklar. Angegeben sind die HAH-Titer in Abhängigkeit der Fütterungstage. Die

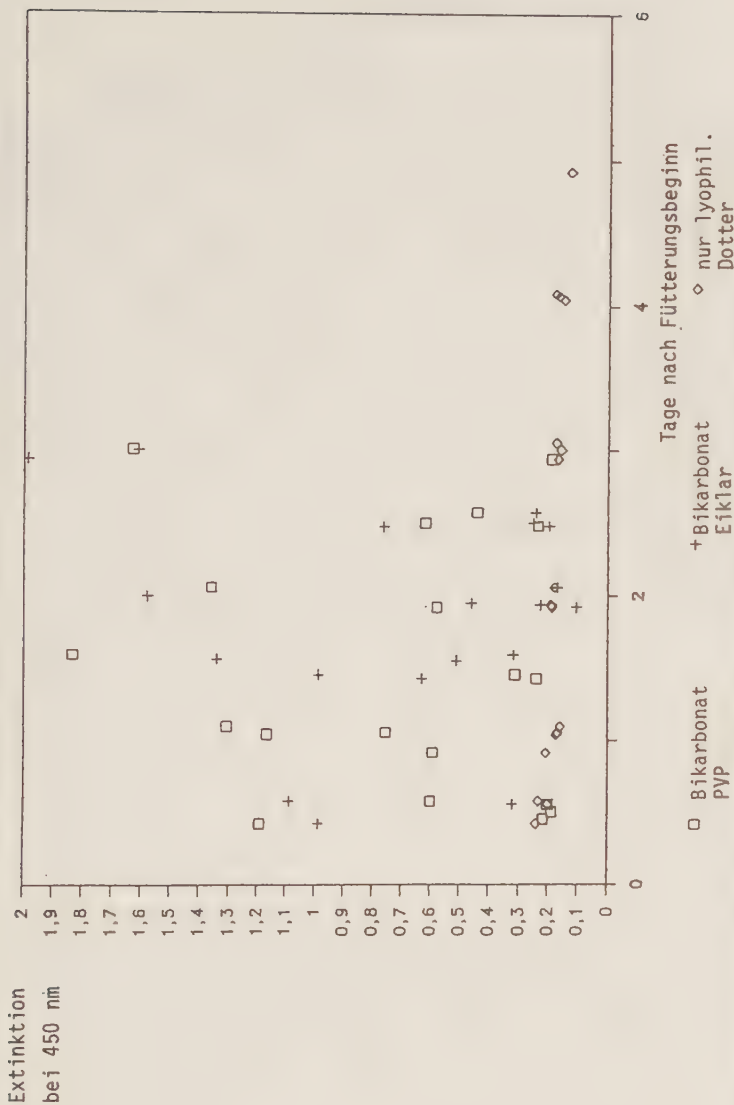


Abbildung 6: Antikörpergehalt von Kotproben nach Zufütterung von lyophil. Dotter allein bzw. Zusatz von Bikarbonat und PVP oder Bikarbonat und Eiklar. Angegeben sind die Extinktionen im Anti-Hühner-IgG-ELISA in Abhängigkeit der Fütterungstage. Eiklar bzw. PVP und Bikarbonat wurden über 3 Tage zugefüttert, lyophil. Dotter allein über 5 Tage.



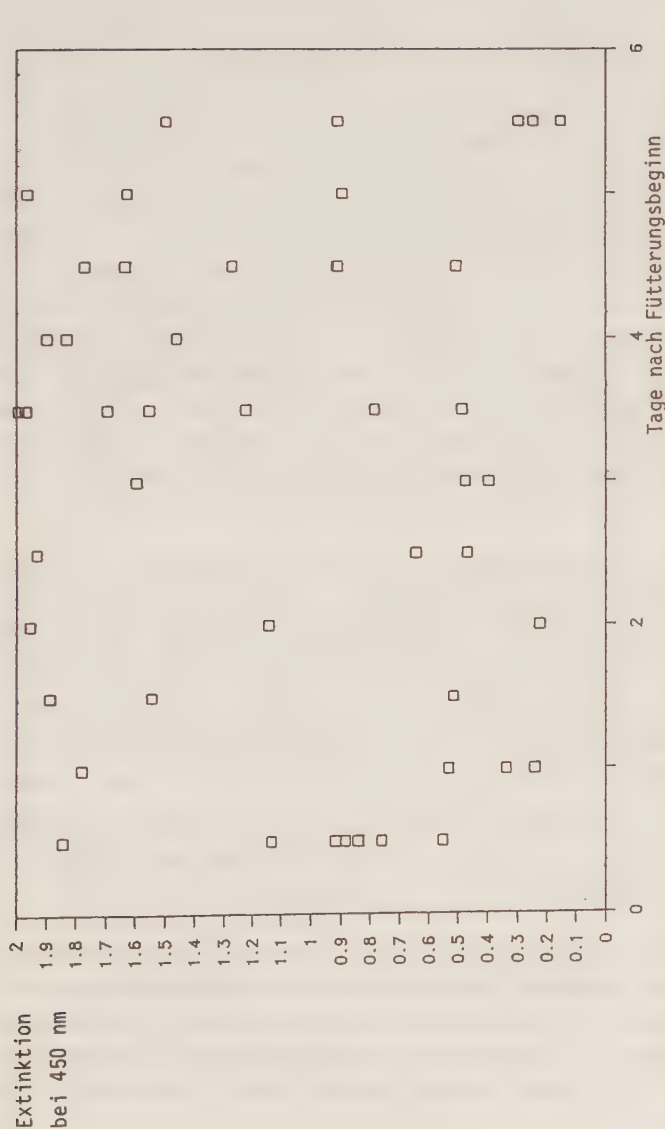


Abbildung 8: Antikörpergehalt von Kotproben nach Zufütterung von lyophil. Dotter, Bikarbonat, PVP und Eiklar. Angegeben sind die Extinktionen im Anti-Hühner-IgG-ELISA in Abhängigkeit der Fütterungstage. Die Zufütterung erfolgte über 5 Tage. Sämtliche Proben waren 1:1.000 vorverdünnt.

#### 4. Besprechung der Ergebnisse

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es, Antikörper gegen CPV-2 herzustellen. Daher bestand der erste Schritt in der Produktion des Immunogens. Dazu wurde CPV-2 zunächst auf MDCK-Zellen vermehrt. Es trat nicht bei allen Passagen ein cpE auf, doch nach mehreren Passagen steigerte sich der Virustiter, gemessen in der HA, auf einen Wert von 1:512. Aus dieser Virussuspension konnte im Sucrosegradienten genügend Virusmaterial gereinigt werden, um es als Immunogen und als Antigen im ELISA zum Nachweis von AK gegen CPV-2 zu verwenden. Die bei der Virusreinigung beobachteten zwei Virusbanden entsprachen den Angaben der Literatur. Danach entstehen bei der Vermehrung von Parvovirus in Zellkultur häufig neben intakten Virionen auch leere Kapside, die ein unterschiedliches spezifisches Gewicht aufweisen ( Burton et al., 1979 ).

Die Etablierung eines Neutralisationstestes gelang aufgrund des unregelmäßig auftretenden cpEs nicht. Da jedoch für CPV-2 nachgewiesen war, daß Antikörper, die hämagglutinationshemmend sind, auch neutralisieren ( Carmichael et al., 1980 ), verwendeten wir ausschließlich die HAH zum Nachweis der biologischen Aktivität.

Der CPV-2-Stamm Ka/Be zeigte sich als hervorragendes Immunogen und löste sowohl bei den Mäusen wie auch bei den Hühnern eine starke Immunantwort aus.

Mäuse entwickelten einen HAH-Titer bis 1:25.600. Nach Fusionen von Milzzellen dieser Mäuse mit Myelomzellen konnten drei monoklonale Antikörper hergestellt werden. Sie wiesen, nach Vermehrung in der Bauchhöhle von Pristan vorbehandelten Mäusen, in der HAH einen

Titer bis zu 1:32.000 auf. Da die drei HAH positiven Antikörper von derselben Primärkolonie stammten, darf angenommen werden, daß sie identisch sind und dasselbe Epitop auf dem Parvovirus erkennen. Vermutlich besaßen sie auch neutralisierende Eigenschaften. Die geringe Anzahl monoklonaler AK war nicht der einzige Grund, nicht weiter mit diesen zu arbeiten. Vielmehr war es nicht möglich, in Zellkulturüberständen höhere HAH-Titer als 1:160 zu erreichen. Zwar war der HAH-Titer des Aszites recht hoch, doch schien es ethisch nicht vertretbar, Antikörper zur oralen Verabreichung in der Bauchhöhle von Mäusen herzustellen. Hinzu kam, daß es bei Untersuchungen von Sherman et al. ( 1983 ) über die Verfütterung von monoklonalen Antikörpern zur Bekämpfung von E.coli-Diarrhoen beim Kalb nur zu einer geringen Reduktion der klinischen Erkrankung kam. Daher erschien der Einsatz polyklonaler Antikörper in der Form von Dotterantikörpern erfolgversprechender und tierschutzgerecht.

Die Hühner entwickelten, wie von Lösch et al. ( 1986 ) beschrieben, eine starke und vor allem lang anhaltende Immunantwort. Dotterproben zeigten drei Wochen nach der ersten Immunisierung einen HAH-Titer von 1:6.800, der sich durch eine einmalige Reimmunisierung auf 1:12.800 steigern ließ. Selbst neun Monate nach der ersten Immunisierung war der AK-Gehalt, gemessen in der HAH, noch unverändert hoch. Eine interessante Beobachtung ist, daß die Immunisierung und die Reimmunisierung zwar zu einer Erhöhung der spezifischen AK-Menge führte, nicht aber zu einer Erhöhung des Gesamt-AK-Gehaltes. Der gemessene IgG-Gehalt im Dotter lag zwischen 15 und 19 mg/ml. Die Antikörperproduktion im Huhn stellt somit eine Möglichkeit dar, große Mengen von Antikörpern auf tierschutzgerechte Art und Weise herzustellen.

In dieser Arbeit wäre es nicht nötig gewesen, die Dotter-AK weiter aufzureinigen. Da jedoch anfänglich mit Problemen beim Nachweis von Hühner-AK mit Anti-CPV-2-Aktivität, vor allem in der HAH, gerechnet wurde, etablierten wir die Isopropanol- und Dextransulfataufreinigung. Es erwies sich zudem als günstig, den Dotter zu lyophilisieren. Er ließ sich in lyophilisierter Form besser lagern und weiterverarbeiten. Bei den unterschiedlichen Aufreinigungsarten zeigte sich, daß die Dextransulfataufreinigung nach Jensenius et al. ( 1981 ) der Isopropanolaufreinigung nach Bade und Stegemann ( 1984 ) in Ausbeute und Reinheit überlegen war. Bei der Dextransulfatmethode trat ein Verlust von nur 15% der ursprünglichen AK-Menge auf, und nach der SDS-Page war im Gel eine sehr saubere IgG-Bande erkennbar. Bei der Isopropanolmethode trat ein Verlust von 30% der ursprünglichen AK-Menge auf, und zudem waren nach der SDS-Page im Gel neben der IgG-Bande viele zusätzliche Banden erkennbar, die von Verunreinigungen herrührten. Die Dextransulfataufreinigung ist also die Methode der Wahl, wenn für bestimmte Fragestellungen sehr saubere Antikörper benötigt werden.

Anschließend wurde in vitro die Widerstandsfähigkeit der Dotter-AK gegen Einflüsse, die während einer natürlichen Verdauung auf sie einwirken, überprüft. Als die zwei wichtigsten Faktoren für einen Aktivitätsverlust der AK während der Magen-Darm-Passage werden das saure Magenmilieu sowie die enzymatische Verdauung durch Proteasen im Darm angesehen ( Newby et al., 1976 ). Deshalb behandelten auch wir die Dotter-AK mit Säure und setzten sie einer Trypsin/Chymotrypsinverdauung aus. Nach diesen Behandlungen testeten wir die AK in der HAH auf ihre biologische Aktivität, sowie im ELISA auf ihre Bindungsfähigkeit an CPV-2. Nach Säurebehandlung zeigte

sich ein deutlich pH-abhängiger Abfall des HAH-Titers. Dabei spielte die unterschiedliche Zeitdauer der Säureeinwirkung von einer halben bzw. zwei Stunden keine Rolle. Eine Inkubation bei einem pH von 5,6 und 4,0 führte zu einem Abfall des HAH-Titers von 1:12.800 auf 1:10.240, eine Inkubation bei pH 2,2 dagegen zu einem Abfall auf 1:2.560. Dies entspricht einer Titerreduktion von 80%. Im Anti-CPV-2-ELISA konnte dagegen nur ein geringer Aktivitätsverlust festgestellt werden. Lösch et al. ( 1986 ) hatten ebenfalls einen Abfall der AK-Aktivität nach einer Säurebehandlung in Abhängigkeit des pH-Wertes beobachtet. Auch in dieser Arbeit war die Absenkung des pH-Wertes von entscheidenderer Bedeutung als die Behandlungsdauer. Jedoch testeten diese Autoren Dotter-AK nach Behandlung bei pH 0,6 bis 1,4. Ein möglicher Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte in den wesentlich niedrigeren pH-Werten liegen.

Die Trypsin/Chymotrypsinbehandlung wurde über 10, 30 und 60 Minuten durchgeführt. Nach Behandlung über 10 und 30 Minuten war in der HAH nur ein geringer Aktivitätsverlust festzustellen. In beiden Fällen fiel der HAH-Titer von 1:12.800 auf 1:9.600. Nach einer Behandlungsdauer von 60 Minuten fiel der Titer auf 1:4.800 ab, was einem Abfall um 62,5% entspricht. Im Gegensatz zur Säurebehandlung fiel auch die im ELISA gemessene Aktivität nach Trypsin/Chymotrypsin-Behandlung deutlich ab. Nach der Säurebehandlung scheinen die AK noch an Parvovirus binden zu können, obwohl sie einen Großteil ihrer biologischen Aktivität verloren haben. Nicht ausgeschlossen werden kann aber, daß Protease-behandelte AK an CPV-2 zwar binden, im ELISA aber nicht erkannt werden, da das Fc-Stück des IgG abgespalten bzw. modifiziert wurde. Anti-Spezies-IgG-Antikörper sind jedoch vor allem gegen das Fc-

Stück gerichtet. Überträgt man diese Beobachtungen auf das in vivo-System, kann man vermuten, daß die proteolytische Verdauung die AK mehr schädigt als die Säureeinwirkung des Magenmilieus, und es somit bei einer oralen Verabreichung von Antikörpern äußerst wichtig ist, sie nicht nur vor der Säureeinwirkung des Magens zu schützen, sondern zusätzlich vor den Proteasen.

Eigentliches Ziel der Arbeit war es, CPV-2-spezifische Dotter-AK an Hunde zu verfüttern und biologische Anti-CPV-2-Aktivitäten bzw. Hühnerimmunglobuline im Kot der Tiere nachzuweisen. Dazu wurde eine Gruppe von vier Beagles im Alter von vier Monaten und einem Körpergewicht von 10 kg und ein Beagle, der einen Monat jünger war und nur 5 kg wog, mit verschiedenen Präparationen von Dotter-AK gefüttert. Alle Tiere waren trotz nachgewiesener maternaler AK, vor Versuchsbeginn an Parvovirose erkrankt (endemisch bzw. experimentell). Für den Fütterungsversuch wurden jeweils zwei bis drei Tiere ausgewählt und einzeln gehalten, um von jedem Hund getrennt Kotproben sammeln zu können. Die Kotproben wurden anschließend in der HAH und im Anti-Hühner-IgG-ELISA untersucht. Während sämtlicher Fütterungsversuche war keine negative Beeinflussung der Verdauung der Hunde durch die Dotterfütterung oder einen der Zusätze festzustellen.

Die Untersuchung der Kotproben stellte sich problematisch dar. Vor der Untersuchung in der HAH mußten die Kotproben sorgfältig abzentrifugiert werden. War nach der Verdünnung in NaCl-PP und der anschließenden Zentrifugation der Überstand noch trübe, trat regelmäßig eine Isoagglutination der Schweineerythrozyten auf, die vermutlich durch muköse Bestandteile des Kotes bedingt war. Alle Proben mußten zuerst bei 56 °C für

30 Minuten inaktiviert und zur Untersuchung in der HAH anschließend über Nacht auf dem Schüttler bei 4 °C an Schweineerythrozyten absorbiert werden. Ohne diese Vorbehandlung war die HAH nicht auswertbar. Appel et al. ( 1979 ) und Carmichael et al. ( 1980 ) beschrieben, daß CPV-2 Schweineerythrozyten in einem pH-Bereich von 6,0 bis 8,2 zu agglutinieren vermag. Bei unseren Untersuchungen mußten die Kotproben jedoch auf einen pH-Wert von mindestens 6,8 hochgepuffert werden, um eine Isoagglutination der Schweineerythrozyten zu verhindern.

Die Ergebnisse der HAH ließen sich im Anti-CPV-2-ELISA nicht verifizieren. Hier reagierten alle Proben negativ. Wir erklärten dies mit einer teilweisen Verdauung der AK. Die Verdauungsenzyme mußten die AK so zerschnitten haben, daß die POD-markierten Kaninchen-Anti-Hühner-IgG-Seren sich nicht mehr an sie binden konnten. Dies ist im Einklang mit den in vitro-Untersuchungen, besonders der Trypsin/Chymotrypsin-Behandlung. Auch hier war ein Abfall der AK-Aktivität beobachtet worden. Aber trotz des teilweisen Abbaues mußten die AK noch in der Lage sein, an CPV-2 zu binden, da sie ja in der HAH eine Anti-CPV-2-Aktivität gezeigt hatten. Deshalb mußten die in der HAH positiven Kotproben im Hemm-ELISA ein positives Ergebnis zeigen. Dies war auch der Fall, doch hemmten auch Kotproben, die von Zeitpunkten stammten, zu denen keine AK gefüttert wurden. Die Erklärung hierfür liegt darin, daß alle Hunde kurz zuvor an Parvovirose erkrankt gewesen waren, was der HAH-Titer ihrer Seren bestätigte, und sie daher wahrscheinlich Kopro-Antikörper ausschieden. Dies bestätigt die Untersuchungen von Rice et al. ( 1982 ) und Nara et al. ( 1983 ), die beobachteten, daß Koproantikörper und somit die lokale Immunantwort bei der Parvovirose eine entscheidende Rolle spielen. Diese Kopro-AK wurden in

der HAH nicht erfaßt. Zusätzlich war im Hemm-ELISA keine Unterscheidung zwischen Hühner- und Dotter-AK möglich. Deshalb wurden abschließend die Kotproben im Anti-Hühner-IgG-ELISA getestet. Hier bestätigten sich die Ergebnisse der HAH. Sämtliche Proben, die in der HAH einen Titer von über 1:20 aufwiesen, zeigten auch eine deutliche Extinktion im ELISA, und sämtliche Proben, die keine Hühner-AK enthalten konnten, waren im ELISA negativ. Eine Reihe von Proben, die in der HAH aufgrund der mangelnden Empfindlichkeit dieses Tests keinen Titer zeigten, wies im ELISA Extinktionen auf, die zwischen denen der HAH positiven und der garantiert keine Hühner-AK enthaltenden Proben lagen.

Mit den so etablierten Nachweisverfahren wurden sämtliche Kotproben aus den verschiedenen Fütterungsversuchen getestet. Dabei zeigte sich nach der Verfütterung von lyophilisiertem Dotter ohne jegliche Zusätze, daß keine AK mehr im Kot nachweisbar waren. Weder in der HAH noch im ELISA war eine der Kotproben positiv. Hilpert et al. ( 1987 ) hatten bei der Verabreichung von Milch-AK an gesunde Kinder eine fast vollständige Verdauung der AK festgestellt. Um eine Passage funktioneller AK durch den Darmkanal zu erreichen sind also Zusätze oder andere Verfahren nötig. Dazu wurde zusätzlich zum Dotter noch Bikarbonat und Eiklar bzw. PVP zugesetzt. Danach wurde ein gewisser Schutz der AK beobachtet. In beiden Versuchen wurden Kotproben gefunden, die sowohl in der HAH, wie auch im ELISA positiv waren. In keinem der Versuche war jedoch eine konstante Ausscheidung von AK über den gesamten Versuchszeitraum festzustellen. Die Bikarbonatzufütterung bei beiden Versuchen sollte einen gewissen Schutz vor der Säureeinwirkung des Magens erzeugen. Die Erhöhung der Dottermenge nach dem ersten Fütterungsversuch von 5 g auf 7 g konnte nicht ausschlaggebend gewesen sein für den Schutz der

AK, sonst hätten bei dem leichteren Hund, der die selben Dottermengen wie die anderen Hunde zugefüttert bekam, also somit pro kg Körpergewicht fast die doppelte Menge erhielt, mehr AK wiedergefunden werden müssen. Dies war jedoch nicht der Fall.

Bei der Zufütterung von AK in dünndarmlöslichen Kapseln sowie einem Eiklar wurde kein besseres Ergebnis wie nach der Verfütterung von lyophilisiertem Dotter mit Zusatz von Eiklar und Bikarbonat festgestellt. Auch hier wiesen einige der Kotproben einen positiven HAH-Titer auf und zeigten deutliche Extinktionen im ELISA. Wir führten dieses positive Ergebnis eher auf die schützende Funktion des Eiklars zurück als auf die Verkapselung des Dotters. Es zeigte sich bei diesem Versuch deutlich, daß die Verkapselung keinen Vorteil gegenüber der Bikarbonat-Zufütterung bringt. Selbst wenn Kapseln den besseren Schutz der AK vor der Magensäure bieten, unterstreicht dieses Ergebnis nur, daß ein alleiniger Schutz der AK vor der Säureeinwirkung nicht ausreicht, sondern der zusätzliche Schutz vor den Verdauungsenzymen äußerst wichtig, wenn nicht gar wichtiger zu sein scheint. Schließlich werden die verwendeten Gelatinekapseln nicht mehr hergestellt, da bei ihrer Produktion Formalin verwendet wird.

Bei der gemeinsamen Zufütterung von Eiklar und PVP sowie zusätzlich Bikarbonat konnte mit Abstand der beste Schutz der AK während der Magen-Darmpassage erreicht werden. Hier wurden bei den meisten Kotproben positive HAH-Titer sowie positive Extinktionen im ELISA gefunden. Dabei waren sowohl die jeweils festgestellten HAH-Titer und ELISA-Extinktionen die höchsten aller untersuchten Kotproben. Auch war bei diesem Versuchsansatz eine fast kontinuierliche AK-Ausscheidung mit dem Kot zu beobachten. Dieser Ver-

such bestätigte nicht nur die schützende Wirkung von Eiklar und PVP, er zeigte auch bei gemeinsamer Verabreichung beider Substanzen einen additiv-synergistischen Effekt. Die Zufütterung von Bikarbonat, PVP und Eiklar kann somit AK während der Magen-Darm-Passage schützen, und macht es dadurch möglich, AK in noch biologisch aktiver Form durch den Verdauungskanal zu schleusen.

Im Gegensatz zu allen zitierten oralen Verabreichungen von AK ist es in diesem Versuch erstmals gelungen, nach Fütterung von AK an gesunde Tiere diese in biologisch aktiver Form im Kot wiederzufinden. Dadurch konnte der Beweis erbracht werden, daß AK auch im Dünndarm in biologisch aktiver Form vorlagen. Sherman et al. ( 1983 ), Bartz et al. ( 1980 ) und Snodgrass et al. ( 1977 ), die ebenfalls AK an Tiere verfüttert hatten, verglichen mit AK gefütterte Tiere mit einer Kontrollgruppe, die keine AK erhalten hatte. Versuche AK im Kot nachzuweisen, wurden allerdings nicht durchgeführt. Hilpert et al. ( 1987 ) verabreichten Kindern, die an Rotavirose erkrankt waren, AK aus Kuhmilch mit Aktivität gegen humanes Rotavirus. Dieser Gruppe gelang es in Stuhlproben neutralisierende AK bei 43% der Kinder wiederzufinden. Zusätzlich verabreichten sie diese AK an gesunde Kinder. In dieser Kontrollgruppe fanden sie nur in 3% der Fälle neutralisierende AK im Stuhl wieder. Dies zeigt, daß unter physiologischen Bedingungen oral verabreichte AK fast vollständig verdaut werden, was auch bei der alleinigen Zufütterung von lyophilisiertem Dotter gesehen wurde. Sollen AK oral zur Prophylaxe oder Therapie eingesetzt werden, müssen sie geschützt werden. Dies ist, zumindest bei Dotter-AK, durch Zugabe von PVP, Eiklar und Bikarbonat möglich. Ob diese Zusätze auch andere Substanzen oder Materialien, wie zB.

attenuierte Viren, die als lokale Vakzinen im Dünndarm einzusetzen sind, schützen, ist noch nicht bekannt. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten auch in diesem Hinblick interessant sein.

Ebenso konnte in diesem Versuch nur eine begrenzte Zahl von Substanzen bzw. Faktoren, die einen Schutz auf oral verabreichte AK haben könnten, getestet werden. Das Modell CPV-2-Antikörper beim Hund bietet jedoch hervorragende Voraussetzungen, weitere Faktoren auszutesten. Von Vorteil ist zudem, daß Dotter-AK leicht und in großen Mengen herzustellen sind, und zum Nachweis von AK mit Anti-CPV-2-Aktivität mit der HAH und dem ELISA zwei Tests zur Verfügung stehen, die sowohl eine Aussage über die biologische Aktivität wie auch über die quantitative Ausscheidung der AK zulassen.

Vor allem aber ist es nach diesen Versuchen möglich, der Aufklärung der Pathogenese der Parvovirose einen Schritt näher zu kommen. Ist der Eintrittsort von CPV-2, wie von Carman und Povey ( 1985 ) und Osterhaus et al. ( 1980 ) vermutet, der Dünndarm, müßte es möglich sein, durch orale Verabreichung von Dotter-AK mit Anti-CPV-2-Aktivität unter Zusatz von Eiklar und PVP sowie Bikarbonat, Hunde vor der Erkrankung an Parvovirose zu schützen. Dies könnte in einem Infektionsversuch abgeklärt werden. Dieser müßte folgendermaßen aufgebaut sein: eine Gruppe von Hunden bekommt Dotter-AK sowie die oben beschriebenen Zusätze, zwei Tage vor einer Infizierung beginnend, zugefüttert. Eine andere Gruppe wird herkömmlich gefüttert. Anschließend werden beide Gruppen mit einer definierten Virusmenge infiziert. Erkrankten die mit AK gefütterten Tiere trotzdem, würde dies dafür sprechen, daß CPV-2, wie von Potgieter et al. ( 1981 ) und Meunier et al. ( 1985 ) vermutet, über

den Pharynx in den Körper gelangt und die Parvovirose des Hundes somit eine rein systemische Erkrankung darstellt. Erkrankten die Tiere nicht oder weniger stark als die Kontrollgruppe, würde dies für eine Virusaufnahme über den Darm sprechen. Zusätzlich könnte versucht werden, in einem Feldversuch die Wirksamkeit der Dotter-AK-Verfütterung zusammen mit PVP, Eiklar und Bikarbonat abzuklären. Nach wie vor erkranken in der von Pollock und Carmichael ( 1982 ) sowie Gooding et al. ( 1982 ) beschriebenen kritischen Phase viele Welpen an Parvovirose. Ein Zuchtbetrieb, der regelmäßig Probleme mit Parvoviroserkrankungen hat, böte die idealen Voraussetzungen für die Durchführung eines solchen weitergehenden Versuches.

## 5. Zusammenfassung

Der CPV-2-Stamm Ka/Be wurde auf MDCK - Zellen vermehrt und anschließend aufgereinigt. Mit diesem Virusstamm wurden weibliche Balb/C-Mäuse sowie vier Hennen immunisiert. Sowohl die Mäuse wie auch die Hennen entwickelten eine starke Immunantwort. Nach Fusion der Milzzellen der Mäuse mit Myelomzellen konnten monoklonale Antikörper gegen CPV-2 hergestellt werden. Polyklonale Antikörper wurden aus dem Dotter von Eiern immunisierter Hennen gewonnen. Beide Antikörperpräparationen wurden in der HAH und im Anti-CPV-2-ELISA getestet. Die Dotter-Antikörper wurden zusätzlich aufgereinigt und in der Rocket-Immunoelektrophorese sowie in der SDS-Page untersucht. Da die Antikörper oral an Hunde verabreicht werden sollten und daher in großen Mengen benötigt wurden, wurde auf den Einsatz der monoklonalen Antikörper verzichtet. Die Dotter-Antikörper wurden in einem Vorversuch in vitro mit Säure sowie Trypsin/Chymotrypsin behandelt. Daraufhin wurden sie in der HAH und im Anti-CPV-2-ELISA auf ihre verbliebene Aktivität überprüft. Nach den Behandlungen war ein deutlicher Aktivitätsverlust feststellbar, der nach der Trypsin/Chymotrypsin-Behandlung stärker ausgeprägt war. Abschließend wurden die Dotter-Antikörper in verschiedenen Präparationen an Hunde verfüttert und deren Kot in der HAH und im Anti-Hühner-IgG-ELISA auf seinen Gehalt an Dotter-Antikörpern untersucht. In verschiedenen Versuchsansätzen wurde die schützende Wirkung vor einem Aktivitätsverlust von Dotter-AK während der Magen-Darm-Passage durch einen Bikarbonat-, Eiklar- oder PVP-Zusatz zum Futter überprüft. Zusätzlich wurden die Dotter-AK in dünndarmlöslichen Kapseln verabreicht. Es zeigte sich, daß nach einer alleinigen Verabreichung von Hühner-AK in Form von

lyophilisiertem Dotter diese vollständig verdaut wurden. Nach Zusatz von Bikarbonat und Eiklar bzw. PVP wurden einige in der HAH und im Anti-Hühner-IgG-ELISA positive Kotproben gefunden, allerdings nicht konstant. Die Verabreichung in verkapselter Form brachte gegenüber der Bikarbonat-Zufütterung keine Vorteile. Nach Zufütterung von Bikarbonat, Eiklar und PVP waren die untersuchten Kotproben regelmäßig in der HAH und im ELISA positiv. Eiklar und PVP üben unter Bikarbonatzusatz auf oral verabreichte Dotter-AK eine Schutzfunktion während der Magen-Darm-Passage aus, die sich bei der gemeinsamen Verabreichung noch verstärkt. Auf diese Weise konnten Dotter-AK in biologisch noch aktiver Form durch den Verdauungstrakt von Hunden geschleust werden.

## 6. Summary

### **Detection of orally administered antibodies against canine parvovirus type-2 in feces of dogs.**

CPV-2 strain Ka/Be was propagated in MDCK cells and purified. Female Balb/C mice and four hens were immunized with this virus strain. Both mice and hens showed a strong immune response. Monoclonal antibodies were produced after fusing spleen cells of the mice with myeloma cells. Polyclonal antibodies were isolated from the egg yolk from the immunized hens. Both antibody preparations were tested by HI and Anti-CPV-2-ELISA. Yolk antibodies were further purified and analyzed by Rocket-Immunelectrophoresis and SDS-Page. Since the antibodies were to be orally administered to dogs and large quantities were required, it was decided to use only the yolk antibodies. In a preliminary in vitro test the yolk antibodies were treated with acid and trypsin/chymotrypsin. A marked decrease in their activity in HI and Anti-CPV-2-ELISA was observed post treatment. It was more pronounced with trypsine/chymotrypsine.

Dogs were fed various egg yolk antibody solutions and the content of yolk antibodies in the feces was analyzed by HI and Anti-Chicken-IgG-ELISA. In various experimental series the protective action of bicarbonate, egg white and PVP as additives to orally fed egg yolk antibodies was investigated. In addition the egg yolk antibodies were administered in acid resistant capsules. It was found, that a complete digestion of yolk antibodies occurred after a single administration of lyophilized egg yolk. Infrequently HI and Anti-Chicken-IgG-ELISA positive feces samples were found when bicarbonate and egg white or

bicarbonate and PVP were added. The administration as a capsule did not offer to prove any advantages over bicarbonate addition. When bicarbonate, egg white and PVP were added to the antibodies, a significant protective effect was seen. With this form of application the feces samples regularly tested positive in HI and Anti-Chicken-IgG-ELISA. Egg white or PVP combined with bicarbonate has a protective effect on orally administered yolk antibodies, which is intensified when all three substances are given together. Through these protective measures it was possible to passage biologically active egg yolk antibodies through the gastrointestinal tract of dogs.

## 7. Literaturverzeichnis

AFSHAR A., 1981:

Canine parvovirus infections - a review.  
Vet. Bull. **51**, 605-612.

APPEL M.J.G., B.J. COOPER, H. GREISEN, L.E.

CARMICHAEL, 1978:

Status report: canine viral enteritis.  
J. Am. Vet. Med. Ass. **173**, 1516-1518.

APPEL M.J.G., F.W. SCOTT, L.E. CARMICHAEL, 1979:

Isolation and immunization of a canine parvo-like  
virus from dogs with haemorrhagic enteritis.  
Vet. Rec. **105**, 156-159.

APPLE M., C.R. PARRISH, 1987:

Canine parvovirus type-2.  
in: Virus Infections of Carnivores, APPLE M., Ed.,  
Amsterdam Oxford New York Tokyo, Elsevier, 69-  
92.

ARENS M., H. KRAUSS, 1980:

Zum Nachweis von Parvovirus bei infektiösen  
Gastroenteritiden des Hundes mittels  
Immunelektromikroskopie.  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **93**, 156-157.

AZETAKA M., T. KIRASAWA, S. KONISHI, M. OGATA, 1981:

Studies on canine parvovirus isolation,  
experimental infection and serologic survey.  
Jpn. J. Vet. Sci. **43**, 243-255.

BACHMANN P.A., W. EICHHORN, G. BALJER, H. WOERNLE, J.

WIEDA, P. PLANK, W. BECKER, A. MAYR, 1985:  
Muttertierimpfung gegen Diarrhoen bei Kälbern:  
Ergebnisse eines Feldversuches.  
Tierärztl. Umschau **40**, 8-14.

- BACHMANN P.A., W. EICHHORN, R.G. HESS, 1982:  
Aktive Mutterschutzimpfung: Passive Immunisierung  
von Neugeborenen.  
Tierärztl. Umschau **37**, 684-703.
- BADE H., H. STEGEMANN, 1984:  
Rapid method of extraction of antibodies from hen  
egg yolk.  
J. Immunol. Meth. **72**, 421-426.
- BAKER J.A., D.S. ROBSON, J.H. GILLESPIE, 1959:  
A nomograph that predicts the age to vaccinate  
puppies against distemper.  
Cornell. Vet. **49**, 158-167.
- BARNES G.L., L.W. DOYLE, P.H. HEWSON, A.M.L. KNOCHES,  
J.A. MCLELLAN, W.H. KITCHEN, R.F. BISHOP, 1982:  
A randomised trial of oral gammaglobulin in low-  
birth-weight infants infected with rotavirus.  
Lancet **1**, 1371-1373.
- BARTZ C.R., R.H. CONKLIN, C.B. TUNSTALL, J.H. STEELE,  
1980:  
Prevention of murine rotavirus infection with  
chicken egg yolk immunoglobulins.  
J. Infect. Dis. **142**, 439-441.
- BASS E.P., M.A. GILL, W.H. BECKENBAUER, 1982:  
Development of a live, canine origin parvovirus  
vaccine.  
J. Am. Vet. Med. Ass. **181**, 909-913.
- BIENENSTOCK J., A.D. BEFUO, 1980:  
Mucosal immunology.  
Immunology **41**, 249-270.

BINN L.N., E.C. LAZAR, G.A. EDDY, 1970:

Recovery and characterization of a minute virus of canines.

Infect. Immun. 1, 503-508.

BISHOP S.P., P. HINE, 1975:

Cardiac muscle cytoplasmic and nuclear development during canine neonatal growth.

in: Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism., ROY R.E., P. HARRIS, Eds., Baltimore, MD, University Park Press, 77-98.

BURTONBOY G., F. COIGNOUL, N. DELFERRIERE, P.P. PASTORET, 1979:

Canine hemorrhagic enteritis: detection of viral particles by electron microscopy.

Arch. Virol. 61, 1-11.

CARMAN P.S., R.C. POVEY, 1980:

Experimental challenge of dogs with parvovirus-2. Vet. Rec. 107, 447.

CARMAN P.S., R.C. POVEY, 1982:

Successful experimental challenge of dogs with canine parvovirus-2.

Can. J. Comp. Med. 46, 33-38.

CARMAN P.S., R.C. POVEY, 1985:

Pathogenesis of canine parvovirus-2 in dogs: haematology, serology and virus recovery.

Res. Vet. Sci. 38, 134-140.

CARMAN P.S., R.C. POVEY, 1985:

Pathogenesis of canine parvovirus-2 in dogs: histopathology and antigen identification in tissues.

Res. Vet. Sci. 38, 141-150.

- CARMICHAEL L.E., L.N. BINN, Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine 1981:  
New enteric viruses in the dog.  
Cornelius, CE, Simpson, CF, , Vol.25, Ed, Academic Press-New York.
- CARMICHAEL L.E., J.C. JOUBERT, R.V.H. POLLOCK, 1980:  
Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications.  
Amer. J. Vet. Res. **41**, 784-792.
- CARMICHAEL L.E., J.C. JOUBERT, R.V.H. POLLOCK, 1983:  
A modified live canine parvovirus vaccine. II. Immune response.  
Cornell. Vet. **73**, 13-29.
- CARMICHAEL L.E., D.S. ROBSON, F.D. BARNES, 1962:  
Transfer and decline of maternal infectious hepatitis antibody in puppies.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **109**, 677-681.
- CHAPEK M.L., L.E. MCCLAUGHRY, L.M. WILKINS, 1980:  
Efficacy and safety of an inactivated feline parvovirus vaccine against canine parvovirus infection.  
Mod. Vet. Pract. **60**, 261-263.
- EICHHORN W., P.A. BACHMANN, G. BALJER, P. PLANK, P. SCHNEIDER, 1982:  
Vakzinierung hochträchtiger Rinder mit einem kombinierten Rotavirus/E. coli - Impfstoff zur Prophylaxe von Durchfallerkrankungen bei neugeborenen Kälbern.  
Tierärztl. Umschau **37**, 599-604.
- EUGSTER A.K., 1980:  
Studies on canine parvovirus infections: development of an inactivated vaccine.  
Amer. J. Vet. Res. **41**, 2020-2024.

- FERTEL R., J.Z. YETIR, M.A. COLEMAN, R.D. SCHWARZ,  
J.E. GREENWALD, J.R. BIANCHINE, 1981:  
Formation of antibodies to prostaglandines in the  
yolk of chicken eggs.  
Biochem. Biophys. Res. Comm. **102**, 1028-1033.
- GILLESPIE J.H., J.A. BAKER, J. BURGHER, 1958:  
The immune response of dogs to canine distemper  
virus.  
Cornell. Vet. **48**, 103-125.
- GOODING G.E., W.F. ROBINSON, 1982:  
Maternal antibody, vaccination and reproductive  
failure in dogs with parvovirus infection.  
Aust. Vet. J. **59**, 170-176.
- HILPERT H., H. BRUSSOW, C. MIETENS, J. SIDOTI, L.  
LERNER, H. WERCHAU, 1987:  
Use of bovine milk concentrate containing antibody  
to rotavirus to treat rotavirus gastroenteritis in  
infants.  
J. Infect. Dis. **156**, 158-166.
- JENSENIUS J.C., I. ANDERSEN, J. HAN, M. CRONE, C.  
KOCH, 1981:  
Eggs: conveniently packed antibodies. Methods for  
purification of yolk IgG.  
J. Immunol. Meth. **46**, 63-68.
- JOHNSON R.H., P.B. SPRADBROW, 1979:  
Isolation from dogs with severe enteritis of a  
parvovirus related to feline panleukopenia virus.  
Aust. Vet. J. **55**, 151.
- KAUFFMAN R.S., J.L. WOLF, R. FINBERG, J.S. TRIER,  
B.N. FIELDS, 1983:  
The 1 protein determines the extend of spread of  
reovirus from the gastrointestinal tract of mice.  
Virology **124**, 403-410.

KEREN D.V., D.J. SCOTT, D. BAUER, 1980:

Variables affecting the local immune response in Thiry-Vella loops. II. Stability of antigen-specific IgG and secretory IgA in acute and chronic Thiry-Vella loops.

J. Immunol. **124**, 2620-2624.

KOLDOVSKY O., P. SUNSHINE, N. KRETCHMER, 1966:

Cellular migration of intestinal epithelia in suckling and weaned rats.

Nature **212**, 1389-1390.

LAURELL C.B., 1966:

Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies.

Anal. Biochem. **15**, 45-52.

LÄMMLI U.K., 1970:

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4.

Nature **227**, 680-685.

LÖSCH U., I. SCHRANNER, R. WANKE, L. JÜRGENS, 1986:

The chicken egg, an antibody source.

J. Vet. Med. B **33**, 609-619.

MACARTNEY L., I.A.P. MCCANDLISH, H. THOMPSON, H.J.C.

CORNWELL, 1984!:

Canine parvovirus enteritis. 1: Clinical, haematological and pathological features of experimental infection.

Vet. Rec. **115**, 201-210.

MACARTNEY L., I.A.P. MCCANDLISH, H. THOMPSON, H.J.C.

CORNWELL, 1984:

Canine parvovirus enteritis. 2: Pathogenesis.

Vet. Rec. **115**, 453-460.

- MAYR A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK, G. WITTMANN,  
1974:  
Virologische Arbeitsmethoden Band 1.  
Jena, Gustav Fischer Verlag.
- MCADARAGH J.P., S.L. EUSTIS, D.T. NELSON, 1982:  
Experimental infection in conventional dogs with  
canine parvovirus.  
Amer. J. Vet. Res. 43, 693-696.
- MCCANDLISH I.A.P., H. THOMPSON, H.J.C. CORNWELL, H.  
LAIRD, N.C. WRIGHT, 1979:  
Isolation of a parvovirus from dogs in Britain.  
Vet. Rec. 105, 167-168.
- MCCANDLISH I.A.P., H. THOMPSON, H.J. CORNWELL, L.  
MACARTNEY, 1980:  
Canine parvovirus infection.  
Vet. Rec. 107, 204-205.
- MCDERMOTT M.R., J. BIENENSTOCK, 1979:  
Evidence for a common mucosal immunologic system.  
I. Migration of B immunoblasts into intestinal,  
respiratory and genital tissues.  
J. Immunol. 122, 1892-1898.
- MCMASTER G., J.D. TRATSCHIN, G. SIEGL, 1981:  
Comparison of canine parvovirus with mink  
enteritis virus by restriction site mapping.  
J. Virol. 38, 368-371.
- MEUNIER P.C., B.J. COOPER, M.J. APPEL, D.O. SLAUSON,  
1985:  
Pathogenesis of canine parvovirus enteritis. I.  
The importance of viremia.  
Vet. Pathol. 22, 60-71.

- MEUNIER P.C., B.J. COOPER, M.J. APPLE, D.O. SLAUSON,  
M. LANIEU, 1985:  
Pathogenesis of canine parvovirus enteritis. II.  
Sequential virus distribution and passiv  
immunization.  
Vet. Pathol. **22**, 617-624.
- MEUNIER P.C., L.T. GLICKMAN, M.J.G. APPEL, S. SHIN,  
1981:  
Canine parvovirus in a commercial kennel:  
epidemiologic and pathologic findings.  
Cornell Vet. **71**, 96-110.
- NARA P.L., K. WINTERS, J.B. RICE, R.G. OLSEN, 1983:  
Systemic and local intestinal antibody response in  
dogs given both infective and inactivated canine  
parvovirus.  
Amer. J. Vet. Res. **44**, 1989-1995.
- NELSON D.T., S.L. EUSTIS, J.P. MCADARAGH, I. STOTZ,  
1979:  
Lesions of spontaneous canine viral enteritis.  
Vet. Pathol. **16**, 680-686.
- NEWBY T.J., F.J. BOURNE, 1976:  
Relative resistance of bovine and porcine  
immunoglobulins to proteolysis.  
Immunol. Comm. **5**, 631-635.
- OSTERHAUS A.D.M.E., G. STEENIS, P. VAN AND DEKREEK,  
1980:  
Isolation of a virus closely related to  
panleukopenia virus from dogs with diarrhea.  
J. Vet. Med. B **27**, 11-21.

- O'SULLIVAN G., P.J.K. DURHAM, J.R. SMITH, R.S.F. CAMPBELL, 1984:  
Experimentally induced severe canine parvoviral enteritis.  
Aust. Vet. **61**, 1-4.
- PARADISO P.R., S.L. RHODE, I.I. SINGER, 1982:  
Canine parvovirus: a biochemical and ultrastructural characterization.  
J. gen. Virol. **62**, 113-125.
- PARRISH C.R., L.E. CARMICHAEL, 1983:  
Antigenic structure and variation of canine parvovirus type-2, feline panleukopenia virus and mink enteritis virus.  
Virology **129**, 401-414.
- PATTERSON R., J.S. YOUNGER, W.O. WEIGLE, F.J. DIXON, 1962:  
The metabolism of serum proteins in the hen and chick and secretions of serum proteins by the ovary of the hen.  
J. gen. Physiol. **45**, 501-513.
- PETERS J.H., H. BAUMGARTEN, M. SCHULZE, 1985:  
Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung.  
Berlin Heidelberg New York Tokyo, Springer-Verlag.
- PIELA Th.H., C.M. GULKA, V.J. YATES, P.W. CHANG, 1984:  
Use of egg yolk in serological tests ( ELISA and HI ) to detect antibody to Newcastle Disease, infections bronchitis and Mycoplasma gallisepticum.  
Avian Dis. **28**, 877-883.

POLLOCK R.V.H., 1982:

Experimental canine parvovirus infection in dogs.  
Cornell Vet. **72**, 103-119.

POLLOCK R.V.H., L.E. CARMICHAEL, 1982:

Maternally derived antibody to canine parvovirus:  
transfer, decline and interference with  
immunization.

J. Am. Vet. Med. Ass. **180**, 37-43.

POLLOCK R.V.H., L.E. CARMICHAEL, 1983:

Use of modified live feline panleukopenia vaccine  
to immunize dogs against canine parvovirus.

Amer. J. Vet. Res. **44**, 169-175.

POTGIETER L.N.D., J.B. JONES, C.S. PATTON, T.A. WEBB-  
MARTIN, 1981:

Experimental parvovirus infection in dogs.

Can. J. Comp. Med. **45**, 212-216.

POVEY C., 1982:

Development of a vaccine incorporating killed  
virus of canine origin for the prevention of  
canine parvovirus infection.

Can. Vet. J. **23**, 15-21.

RICE J.B., K.A. WINTERS, S. KRAKOWKA, R.G. OLSEN,  
1982:

Comparison of systemic and local immunity in dogs  
with canine parvovirus gastroenteritis.

Infect. Immun. **38**, 1003-1009.

ROBINSON W.F., G.E. WILCOX, R.L.P. FLOWER, 1980:

Canine parvoviral disease: experimental  
reproduction of the enteric form with a parvovirus  
isolated from a case of myocarditis.

Vet. Pathol. **15**, 282-293.

ROSE M.E., E. ORLANS, 1981:

Immunoglobulins in the egg, embryo and young chick.

Devel. and Comp. Immunol. 5, 15-20.

ROSE M.E., E. ORLANS, N. BUTTRESS, 1974:

Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white.

Europ. J. Immunol. 4, 521-523.

RUDZIK O., R.L. CLANCY, D.Y.E. PERCY, 1975:

Repopulation with IgA-containing cells of bronchial and intestinal lamina propria after transfer of homologous Peyer's patch and bronchial lymphocytes.

J. Immunol. 114, 1599-1605.

SANDERSLEBEN J., H. KRIEGLEDER, 1979:

Plötzliche Todesfälle bei Welpen infolge Myokarditis.

Schweiz. Arch. Tierheilk. 121, 615-622.

SCHWERS A., P.P. PASTORET, G. BURTONBOY, E. THIRY, 1979:

Frequence en Belgique de l'infection à Parvovirus chez le chien, avant et apres l'observation des premiers cas cliniques.

Ann. Med. Vet. 123, 561-566.

SCOTT F.W., 1980:

Virucidal disinfectants and feline viruses.

Amer. J. Vet. Res. 41, 410-414.

SHERMAN D.M., S.D. ACRES, L. SADOWSKI, J.A. SPRINGER,

B. BRAY, T.J.G. RAYBOULD, C.C. MUSCOPLAT, 1983:

Protection of calves against fatal enteric colibacillosis by orally administered Escherichia coli K99-specific monoclonal antibody.

Infect. Immun. 42, 653-658.

SIEGL G., 1976:

The parvoviruses.

in: Virology Monographs., GARD S., C. HALLAUER,  
Eds., New York, Springer-Verlag, 52-66.

SNODGRASS D.R., P.W. WELLS, 1977:

Human rotavirus in lambs: infection and passive  
protection.

Infect. Immun. **16**, 268-270.

TORRES-MEDINA A., 1981:

Morphologic characteristics of the epithelial  
surface of aggregated lymphoid follicles ( Peyer's  
patches ) in the small intestine of newborn  
gnotobiotic calves and pigs.

Amer. J. Vet. Res. **42**, 232-236.

TRATSCHIN J.D., G.K. MCMASTER, G. KRONAUER, G. SIEGL,  
1982:

Canine parvovirus: relationship to wild-type and  
vaccine strains of feline panleukopenia virus and  
mink enteritis virus.

J. gen. Virol. **61**, 33-41.

WALKER S.T., C.P. FEILEN, M. SABINE, D.N. LOVE, R.F.  
JONES, 1980:

A serological survey of canine parvovirus  
infection in New South Wales.

Vet. Rec. **106**, 324-325.

WALKER W.A., K.J. ISSELBACHER, 1977:

Intestinal antibodies.

N. Engl. J. Med. **297**, 767-770.

- WIERUP M., P. OLSON, A. HEDHAMMER, B. KLINGEBORN,  
K.A. KARLSON, 1982:  
Evaluation of a killed feline panleukopenia virus  
vaccine against canine parvoviral enteritis in  
dogs.  
Amer. J. Vet. Res. **43**, 2183-21897.
- WILLARD M.D., R.W. LEID, 1981:  
Nonuniform horizontal and vertical distributions  
of immunoglobulin A cells in canine intestines.  
Amer. J. Vet. Res. **42**, 1573-1580.
- WOLF J.L., D.H. RUBIN, R. FINBERG, R.S. KAUFFMAN,  
A.H. SHARPE, J.S. TRIER, B.N. FIELDS, 1981:  
Intestinal M cells: a pathway for entry of  
reovirus into the host.  
Science **212**, 471-472.
- YOLKEN R.H., F. LEISTER, S.B. WEE, R. MISKUFF, S.  
VONDERFECHT, 1988:  
Antibodies to rotaviruses in chickens' eggs: a  
potential source of antiviral immunoglobulins  
suitable for human consumption.  
Pediatrics **81**, 291-295.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr danke ich herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Überlassung des Themas. Besonders bedanken möchte ich mich für die Aufgeschlossenheit, diese Arbeit in Zusammenarbeit mit der Dr. Müller-Lierheim AG erstellen zu lassen.

Herrn Dr. W. Eichhorn danke ich für seine hervorragende fachliche Betreuung bei der Anfertigung der Arbeit. Zusätzlich möchte ich mich für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre bedanken.

Herrn Dr. W. Müller-Lierheim danke ich dafür, neben meiner praktischen Tätigkeit in seinem Betrieb, die Möglichkeit und die Unterstützung gehabt zu haben, diese Arbeit anfertigen zu können.

Allen Mitarbeitern der Isolierstation und der Dr. Müller-Lierheim AG danke ich für die stete Unterstützung und das hervorragende Arbeitsklima.

## Lebenslauf

Am 15. April 1960 wurde ich, Joachim Hasenmaier, als Sohn des Landwirts Hermann Hasenmaier und seiner Ehefrau Ruth, geb. Betz, geboren.

Nach vier Jahren Grundschule in Eberdingen/Nussdorf wechselte ich 1970 auf das Friedrich-Abel-Gymnasium in Vaihingen/Enz, wo ich im Juni 1979 die Reifeprüfung ablegte.

Nach der Ableistung des Grundwehrdienstes begann ich im Wintersemester 1980/81 mit meinem Tiermedizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Am 22. Juli 1986 beendete ich das Studium mit dem Abschluß des 3. Staatsexamens.

Seit November 1985 bin ich Mitarbeiter der Dr. Müller-Lierheim AG.

Mit Geltung vom 2. Oktober 1986 wurde mir die Approbation als Tierarzt erteilt.





